

**THIOLE UND PHENOLE
ALS VERSTÄRKER DER SAUERSTOFFAKTIVIERUNG
DURCH PEROXIDASEN:
ENTWICKLUNG VON REAKTIONSMECHANISMEN**

Wolfgang Schütz

Disbui. München

1988

THIOLE UND PHENOLE
ALS VERSTÄRKER DER SAUERSTOFFAKTIVIERUNG
DURCH PEROXIDASEN :
ENTWICKLUNG VON REAKTIONSMCHANISMEN

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
an der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Wolfgang Schütz

München
Mai 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Sandermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 8. 1988

Meinen Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0012

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	13
ERGEBNISSE	17
A. OXIDIERENDE SYSTEME UND IHRE DETEKTION	17
1. Isolierung und Charakterisierung von p-Hydroxyacetophenon aus Fichtennadeln	17
1.1. Isolierung aus Fichtennadeln	17
1.2. Strukturaufklärung	21
1.3. Nachweis und Quantifizierung von pHP in verschiedenen Modellsystemen	25
2. Peroxidase-katalysierte Reaktionen	29
2.1. Ethylen-Bildung aus KMB-ACC-MET	29
2.1.1. Peroxidase-H ₂ O ₂ -System: KMB-Spaltung	29
2.1.2. Peroxidase-Mangan ⁺⁺	33
2.1.3. Gegenüberstellung der Systeme POD-Mn ⁺⁺ /POD-H ₂ O ₂	41
2.1.4. System Peroxidase-Mangan ⁺⁺ - NADH	43
2.1.5. Vergleich der POD-Systeme H ₂ O ₂ - GSH - CYS - HSO ₃ ⁻ ..	44
2.2. Sauerstoff-Elektrode	48
2.3. Crocin-Bleichung	52
2.3.1. System Peroxidase - H ₂ O ₂	52
2.3.2. System Peroxidase-Glutation	58
2.3.3. System POD - Cystein	59
2.3.4. System: Peroxidase - Bisulfit	60
2.3.5. Peroxidase-Mangan ²⁺ -System	62
2.3.6. System Xanthin-Xanthinoxidase im Crocin-Bleichungsansatz	63

B. PEROXIDATIVER ABBAU VON METABOLITEN.....	64
1. Indolessigsäure-Abbau durch POD.....	64
1.1. Messung des Sauerstoffverbrauches.....	64
1.1.1. Einfluß des pH-Wertes.....	64
1.1.2. Stimulation durch p-Hydroxyacetophenon.....	64
1.1.3. Einfluß von NaHSO_3	65
1.1.4. Crocin-Beeinflussung des O_2 -Verbrauchs.....	65
1.1.5. Hemmstoffeinfluß: Kat, SOD, Asc, Prop, Man, Form.....	66
1.1.6. Einfluß der Reaktionsprodukte.....	67
1.1.7. Tryptophan und Peroxidase.....	67
1.2. HPLC-Trennung der IAA-Abbauprodukte.....	68
1.2.1. Identifizierung der Produkte.....	68
1.2.2. pH-Einfluß.....	73
1.2.3. pHAP-Stimulierung.....	74
1.2.4. Picein im POD-IAA-System.....	76
1.2.5. Trennung des Ansatzes POD-IAA-Crocin.....	77
1.2.6. Hemmstoffwirkung auf den IAA- bzw. Crocin-Abbau.....	78
1.2.7. Vergleich: IAA-Abbau durch POD/ POD-Mn^{2+} / $\text{POD-H}_2\text{O}_2$	79
1.2.8. Einfluß von HSO_3^- auf den IAA-Abbau.....	81
1.3. CROCIN-Bleichung.....	83
1.3.1. pH-Einfluß.....	83
1.3.2. Einfluß von pHAP und Picein.....	83
1.3.3. Hemmstoffwirkung.....	85
1.3.4. H_2O_2 -Einfluß.....	87
1.3.5. Wirkung von Bisulfit.....	88
1.3.6. Einfluß von Mangan $^{2+}$ -Ionen.....	89
1.3.7. Reaktionsprodukte aus POD-IAA.....	90
1.3.8. Ersatz für IAA und Peroxidase.....	91
1.4. Ethan-Bildung aus α -Linolensäure.....	91
1.5. Nachweis von Peroxiden.....	92
1.6. Ethylenbildung durch peroxidatischen Abbau.....	93
1.6.1. IAA-Abbau durch POD.....	93
1.6.1.1. Vergleich der Ethylenfreisetzung aus KMB-ACC-MET durch POD-Mn^{2+} -IAA.....	93
1.6.1.2. pH-Einfluß auf die ACC-Spaltung.....	94
1.6.1.3. Grundreaktion POD-Mn^{2+} /pHAP-Stimulation.....	96
1.6.1.4. Konzentrationseinflüsse.....	97
1.6.1.5. Vergleich der Stimulation durch pHAP- HSO_3^-	98
1.6.1.6. Stimulation durch Picein nach Cellulase-Abbau.....	99
1.6.1.7. Hemmstoffeinfluß auf $\text{POD-Mn}^{2+} \pm \text{IAA} \pm \text{pHAP}$	101
1.6.1.8. KMB-ACC-Spaltung bei $\text{pH}=5,7/7,8$	103

1.6.2.	Einfluß der IAA-Abbauprodukte auf die ACC-Spaltung durch $\text{POD-Mn}^{2+}/\text{POD-Mn}^{2+}$ -pHAP.....	105
1.6.3.	Einfluß der Hauptprodukte aus dem peroxidatischen IAA-Abbau auf die ACC-Spaltung.....	106
1.6.4.	Vergleich von POD mit Ascorbat-Oxidase.....	107
1.6.5.	Vergleich: Tryptophan-IAA bezüglich ACC-Spaltung im System POD-Mn^{2+}	108
2.	Cystein-Abbau.....	109
2.1.	Messung des Sauerstoffverbrauchs.....	109
2.1.1.	pH-Einfluß.....	109
2.1.2.	Konzentrationseinflüsse.....	109
2.1.3.	Einfluß durch Crocin.....	110
2.1.4.	Hemmung durch NH_2OH	110
2.1.5.	SOD-Einfluß.....	110
2.1.6.	SOD-Effekt auf Crocin-beeinflußte Reaktion.....	113
2.1.7.	SOD-Effekt auf NH_2OH -beeinflusste Reaktion.....	115
2.2.	Cystein-Bestimmungen durch Ellman.....	116
2.2.1.	Ellman's-Farbstoff: Substrat für POD.....	116
2.2.2.	"Neuer Ellman-Test".....	117
2.2.3.	pH-Einfluß auf POD-CYS.....	118
2.2.4.	Kinetik des Cystein-Abbaus: pHAP-Stimulation.....	118
2.2.5.	Einfluß der pHAP-Konzentration.....	119
2.2.6.	SOD-Einfluß auf den peroxidatischen Cystein-Abbau.....	119
2.2.7.	Hemmstoffeinfluß auf die Reaktion $\text{POD-CYS} \pm \text{pHAP}$	122
2.2.8.	Vergleich zwischen Glutathion und Cystein.....	124
2.3.	HPLC-Trennung.....	126
2.4.	Hydroxylamin-Oxidation.....	127
2.4.1.	pHAP-Einfluß auf die NH_2OH -Oxidation.....	127
2.4.2.	SOD-Hemmung der Nitrit-Bildung.....	128
2.4.3.	Vergleich der Nitrit-Bildung durch peroxidative Systeme: $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{CYS} - \text{GSH} - \text{HSO}_3^-$	129
2.4.4.	Konkurrenz zwischen NH_2OH und Crocin.....	129
2.5.	Crocin-Bleichung.....	131
2.5.1.	pH-Einfluß auf die Crocin-Bleichung durch POD-CYS.....	131
2.5.2.	SOD-Stimulation der Bleichung.....	132
2.5.3.	Konkurrenz: Hydroxylamin-Crocin.....	134

3. Peroxidativer Sulfit-Abbau (Ellman).....	136
3.1. Eichkurve.....	136
3.2. Sulfit-Autoxidation.....	136
3.3. Kinetik des Sulfit-Abbaus durch POD.....	137
3.4. Einfluß von pHAP.....	138
3.5. Hemmstoffwirkung auf Sulfit-Abbau.....	139
 DISKUSSION.....	 140
Verstärkerwirkung durch p-Hydroxyacetophenon.....	140
Seneszenz-Modellreaktionen.....	141
I. Peroxidase-Reaktionen.....	141
II. Crocin-Bleichung.....	144
III. Indol-3-Essigsäure-Abbau.....	148
IV. Ethylenbildung.....	152
 ZUSAMMENFASSUNG.....	 154
 LITERATURVERZEICHNIS.....	 159

ABKÜRZUNGEN

4-AA	4-Aminoantipyrin
ACC	Aminocyclopropancarbonsäure
Asc	Natriumascorbat
Chl	Chlorophyll
CYS	Cystein
DTNB	Dithio-bis-nitrobenzoesäure
For	Natriumformiat
GSH	Glutathion
HDBS	2-Hydroxy-3,5-dichlorobenzolsulfonsäure
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IA	Indol-3-aldehyd
IAA	Indol-3-essigsäure
ICA	Indol-3-carbonsäure
IM	Indol-3-methanol
KAT	Katalase
KMB	α -Ketomethiolbuttersäure
MET	Methionin
Man	Mannit
pHAP	p-Hydroxyacetophenon
POD	Peroxidase
Prop	Propylgallat
PyP	Pyridoxalphosphat
RSA	Rinderserumalbumin
SAM	S-Adenosylmethionin
SOD	Superoxid-Dismutase



EINLEITUNG

Im Jahre 1969 beschrieben McCord und Fridovich ein Enzym aus Rinder-Erythrocyten, das die Dismutation von Superoxid-Radikalanionen katalysiert:



Dieses Enzym, die Superoxid-Dismutase, erwies sich als identisch mit dem schon früher beschriebenen Erythrocuprein (Mann und Keilin, 1939).

Die Entdeckung der Superoxid-Dismutase "katalysierte" die Erforschung erwünschter und unerwünschter Prozesse in biologischen wie medizinischen Systemen, die unter Beteiligung von Sauerstoff, häufig über radikalische Zwischenstufen, ablaufen. Begriffe wie "Sauerstoff-Aktivierung", "Sauerstoff-Toxizität" und "Aktivierte Sauerstoff-Spezies" haben Eingang in verschiedenste Naturwissenschaften gefunden.

Erst in den letzten 10 Jahren hat die Forschung dazu beigetragen, die gewonnenen Kenntnisse über die Sauerstoff-Aktivierung und besonders die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuzeigen und auf die biologische sowie medizinische Praxis zu übertragen.

Molekularer, atmosphärischer Sauerstoff besitzt kein bindungsbereites Elektronenpaar, sondern zwei ungepaarte Elektronen mit parallelem Spin. In diesem Zustand (Triplet-Grundzustand) ist Sauerstoff relativ reaktionsträge, da er nach dem Spin-Verbot nicht mit Atomen im Singulett-Grundzustand (antiparalleler Elektronen-Spin) reagieren kann.

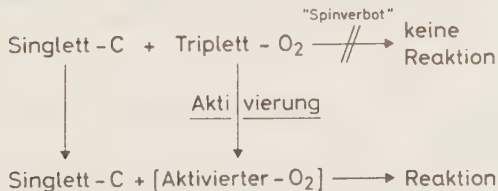
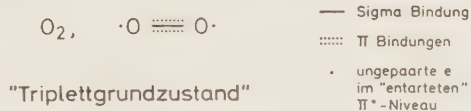


Abb.1: Notwendige Sauerstoff-Aktivierung (Elstner, 1984)

Da fast alle organischen Verbindungen und Moleküle des Zellstoffwechsels in einem Singulett-Grundzustand vorliegen, kann Sauerstoff nicht mit ihnen reagieren, solange er nicht vorher aktiviert worden ist.

Neben der (hier nicht angesprochenen) physikalisch-chemischen Aktivierung ist in biologischen Systemen die chemisch-reduktive Sauerstoff-Aktivierung von großer Bedeutung.

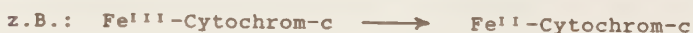
Die chemische Reduktion von Sauerstoff führt zur Entstehung von Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen.

Durch die Enzymsysteme Diaphorase/ NADH bzw. Xanthin-Oxidase/ Xanthin kann durch Übertragung von einem Elektron auf den Sauerstoff das Superoxid-Anionradikal ($O_2^{\cdot -}$) entstehen.

Für die Detektion von $O_2^{\cdot -}$ stehen einige Indikator-Reaktionen zur Verfügung, wobei sowohl seine oxidierende



als auch seine reduzierende Wirkung ausgenützt werden können.



Obige Enzymsysteme (Oxidasen) sind ebenso zu einer zwei-Elektronen-Übertragung befähigt:



Auch die Disproportionierung von Superoxid-Anionen führt zu H_2O_2 , bei pH = 7.0 durch SOD um den Faktor 10000 beschleunigt.

Wasserstoffperoxid ist ein starkes Oxidans, reagiert aber ähnlich dem molekularen Sauerstoff mit dem Reaktionspartner nur sehr langsam.

Durch Katalyse von Spuren reduzierter Übergangsmetalle, wie z.B. Eisen $^{2+}$, entstehen reaktive OH-Radikale:



Dieser als Fenton-Reaktion (1894) bekannte Schritt einer Redox-Kettenreaktion



führt über die hohe Reaktivität von $\cdot OH$ zum meßbaren Effekt (Bors et al, 1980).

Dieser "Nicht-Häm-Eisenkatalyse" stehen die Reaktionen mit einem Protoporphyrin IX gebundenen Eisen-Aktivator gegenüber.

Peroxidase wird durch H_2O_2 am Eisen^{3+} des katalytischen Zentrums zu Eisen^{5+} oxidiert. Dieser als Compound I bekannte Komplex stellt das eigentlich oxidierende Agens dar (Halliwell & Rycker, 1978).

Auch beim Methämoglobin (Fe^{3+}) entsteht durch H_2O_2 dieses reaktive Oxidans (Kanner & Harel, 1985).

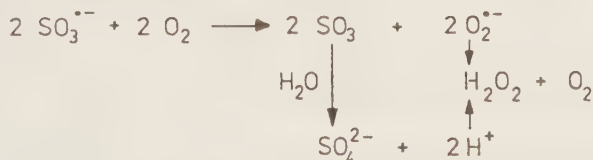
Neben der Aktivierung zunächst wenig reaktiver Sauerstoff-träger durch unterschiedliche Eisenzustände kann das Oxidans auch über die Wechselwirkung mit oxidierbaren Schwefelverbindungen seine Wirkung entfalten.

Sulfit, bei neutralem pH-Wert im Gleichgewicht mit HSO_3^- und geringen SO_2 -Konzentrationen, kann metallkatalysiert auto-oxidieren:

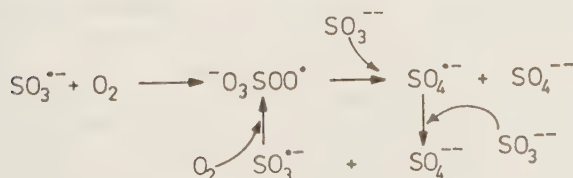


Das dabei entstehende $\text{SO}_3^{\cdot-}$ (auch als $\text{HSO}_3^{\cdot}$ formulierbar) wird für die Schädigung von Sulfit verantwortlich gemacht (Reed et al., 1986).

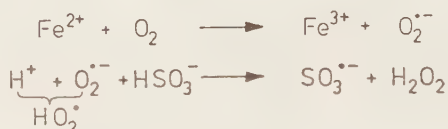
Mit der Sulfit-Radikalbildung geht Sauerstoffverbrauch einher (McCord & Fridovich, 1969):



Von Reed et al. (1986) wird die Entstehung eines freien Peroxyl-Radikals diskutiert, das über Kettenreaktion ebenfalls Sulfat liefert (Hayon et al., 1972):



Neben der Sulfit-Autokatalyse ist auch die Reaktion mit metallkatalysiert entstandenen Superoxidanionen denkbar (Aust et al, 1985):



Die Sulfit-Oxidase (Cohen & Fridovich, 1971) ist in der Lage, Sulfit zum Sulfat "direkt" zu oxidieren, wobei reaktive Radikalzwischenprodukte "vermieden" werden.

Eine wichtige Intention dieser Arbeit war es, durch Modellreaktionen abzuklären, in welchen Systemen Sulfit-Oxidation erfolgt und in welchem Ausmaß dabei Radikale beteiligt sind.

Höhere Pflanzen haben eine Reihe von Abwehrmechanismen gegen Pathogene, seien es Bakterien, Pilze oder Viren, entwickelt. Eine Vielzahl von Schadorganismen können von vornherein einen spezifischen Wirt nicht befallen: Hier spricht man von "Non-Host-Resistance".

Aufgrund struktureller Resistenz (Royle, 1976) ist es wiederum einem großen Teil potentieller Pathogene nicht möglich, in den Wirt einzudringen. Dicke Wachsschichten auf der Oberfläche oder spezielle Stomatastrukturen stellen unüberwindbare mechanische Barrieren dar. Schaderreger, die diese Hürde erfolgreich gemeistert haben, stehen vor biochemischen "Waffen".

Viele Pflanzen sind nun in der Lage, durch vorgeformte Abwehrstoffe, wie Phenole, Steroidglycoside (Saponine), Lactone (Tuliposide) oder schwefelhaltige Verbindungen (Alliin), erfolgreich eingedrungene Pathogene abzuwehren (Overeem, 1976/Schönbeck et al., 1976).

Gegenüber dieser präformierten Verteidigung sind eine Reihe von Pflanzen zur de-novo-Synthese von fungitoxischen Verbindungen in der Lage.

Von solchen Phytoalexinen (Bailey, 1982) sind heute neben den Glyceolinen der Sojabohne eine große Anzahl von Substanzen bekannt.

Führt zumindest eines dieser Schutzsysteme zum Erfolg, so handelt es sich um eine resistente Pflanze; ist dies nicht der Fall, so entwickelt sich eine kompatible Wirt-Pathogen-Wechselwirkung. Für eine gewaltige Anzahl von verschiedenen Pflanzen sind solche Wechselwirkungen bekannt, doch handelt es sich meist um krautige Kulturpflanzen. Sehr wenig weiß man aber über die Wechselwirkungen zwischen Koniferen und ihre Pathogene.

Franich et al. (1983) berichtete über fungitoxische Wirkung einiger Fettsäuren sowie oxidiert Harzsäuren (z.B. Dehydroabiessäure) gegenüber dem Kieferschädling Dothistroma pini. Diese fungitoxischen Substanzen sind in der epikutikulären Wachsschicht von Pinus radiata eingelagert und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr des Pathogens.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es auch, eine fungitoxische Substanz aus Fichte (Picea abies karst.) zu isolieren, deren Struktur aufzuklären, sowie ihre Rolle im pflanzlichen Metabolismus im Zusammenhang mit bestimmten Umweltbelastungen (SO₂!) anhand biochemischer Modellreaktionen zu beleuchten.

Der Begriff Seneszenz bezeichnet den natürlichen Alterungsvorgang im Tier- und Pflanzenreich.

Die Vergilbung der Blätter im Herbst ist ein "normaler" periodischer Vorgang bei Pflanzen. Die Einflußnahme von Phytohormonen ist gerade für dieses Phänomen intensiv untersucht worden. Photoperiodisch gesteuert nehmen Auxine und Gibberelline während der Seneszenz ab, dagegen steigen Abscisinsäure und Ethylen im Gewebe an. Häufig ist der Pigmentabbau durch Protein- und RNA-Abbau begleitet.

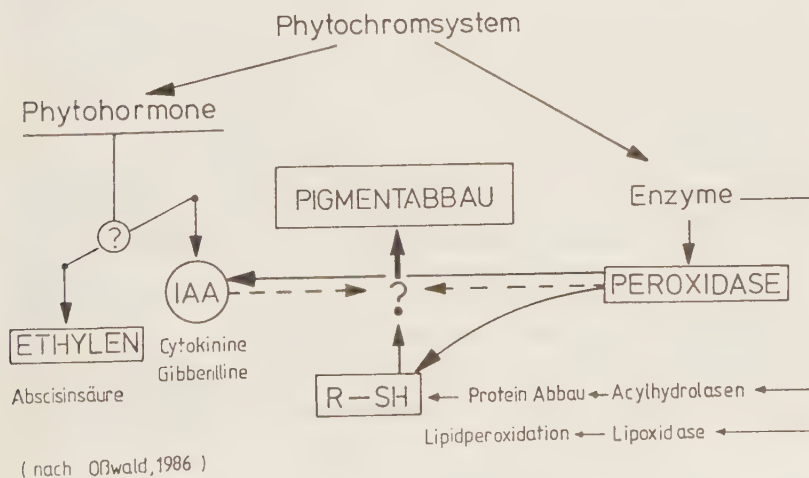


Abb. 2: Wechselwirkungen verschiedener Systeme während des Seneszenzvorganges

Der Verlust pflanzlicher Pigmente wurde schon 1935 von Schmidt als ein Phänomen beschrieben, dem mehrere mögliche Ursachen zu Grunde liegen können.

Eine Reihe von Infektionskrankheiten wird von Chlorophyllabbau begleitet. Das Schadbild "Vergilbung" der von Bakterien und Pilzen ausgelösten Krankheiten sind häufig gelbe, später braune und nekrotische Flecken.

Auch abiotische Faktoren, wie Herbizide oder Luftschadstoffe (SO_2 , HF, Ozon) können die Auslöser von Vergilbung und anschließendem Absterben sein.

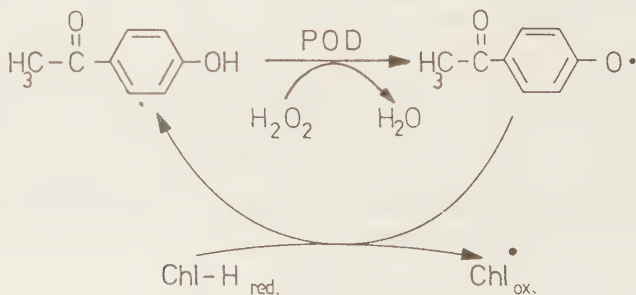
Häufig sind Vergilbungserscheinungen grüner Pflanzen lichtabhängige Prozesse. In Chloroplasten ist aufgrund des hohen Sauerstoffpartialdruckes und hoher Lichtenergie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gegeben. Unter bestimmten Bedingungen kann es zum Stau in der photosynthetischen Elektronentransportkette kommen (Trebst, 1974/Youngman und Elstner, 1984/Elstner, 1982) und die Freisetzung von $^1\text{O}_2$, Superoxidation und damit auch H_2O_2 und OH-Radikal, ist die Folge. Der lichtstimulierte oxidative Pigmentabbau, oft durch Kooxidation von ungesättigten Fettsäuren (Lipidperoxidation) begleitet, ist die Folge (Weber/Grosch, 1976). Zunächst werden Carotinoide und Xanthophylle abgebaut, denen man eine Schutzfunktion der später zerstörten Chlorophylle zuschreibt.

Diese photooxidativen Prozesse können aber nicht für die Auslösung der Blattseneszens verantwortlich gemacht werden, da diese im Dunkeln stattfindet und sogar von Licht verzögert werden kann (Goldthwaite and Laetsch, 1967/Hurng et al., 1986).

Gegenüber der Lichtbleichung durch reduktiv aktivierte Sauerstoffspezies, kann der Chlorophyllabbau auch im Dunkeln durch Chlorophyllasen eingeleitet werden. Eine direkte photometrische Messung des in Chlorophyllid und Phytolrest gespaltenen Chlorophyllmoleküls ist unmöglich, da die Abbauprodukte nahezu identisches Spektrum besitzen (Kuroki et al., 1981).

Ein deutlicher Dunkelabbau erfolgt durch Peroxidase und H_2O_2 unter phenolischer Katalyse (Woods, 1899/Matile, 1980/Huff, 1982/Kato und Shimizu, 1985). Kato zeigte, daß neben Phenol, 2,4-Dichlorphenol, p-Cumarsäure auch das in dieser Arbeit isolierte p-Hydroxyacetophenon den Chlorophyllabbau bewirken kann.

Ohne Phenol erfolgt kein Abbau, da erst durch das in der Peroxidase-Reaktion entstandene Alkoxyradikal Chlorophyll kooxidiert wird, was zur Bleichung führt.



Peroxidasen sind in der Regel in den Peroxisomen (Stafford, 1974) oder in den Vakuolen (Boller und Kende, 1979) lokalisiert, aber Matinoda et al. (1982) konnten eine gebundene Peroxidase innerhalb der Thylakoidmembran des Chloroplasten nachweisen, die nach Ultraschall- und Detergenz-Behandlung aktiviert war.

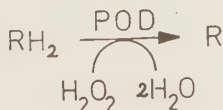
In der vorliegenden Arbeit werden Reaktionen vorgestellt, die verschiedene Seneszenzmodelle, zunächst getrennt in einzelne in-vitro-Systeme mit einer möglichst geringen Anzahl an Komponenten, repräsentieren.

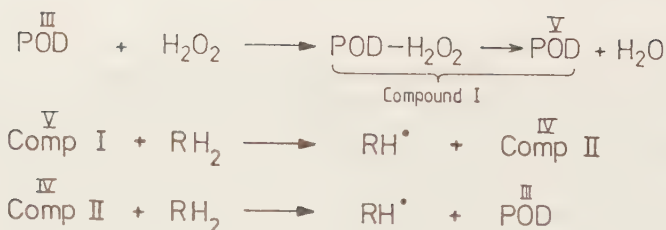
- I. Peroxidase-Reaktionen als reaktive Sauerstoffkomplexe:
Neben H_2O_2 als oxidierendem Substrat, werden auch oxidierbare Substanzen, wie SH-Verbindungen und Mangan²⁺-Ionen auf Sauerstoff-Zehrung und auf ihre Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Nachweismolekülen für reaktive Sauerstoffspezies untersucht.
- II. Peroxidase-Reaktionen in ihrer Fähigkeit ein Modellcarotinoid zu bleichen
- III. Abbau von Indol-3-Essigsäure
- IV. Freisetzung von Ethylen aus dem natürlichen Vorläufer ACC

Durch anschließende Kombination der Einzelmodelle sollen grundlegende Zusammenhänge innerhalb des Komplexes der licht-unabhängigen Seneszenzvorgänge durch reaktive Sauerstoffspezies aufgezeigt werden können.

Hämoproteine sind ubiquitär in der Natur und enthalten alle Protoporphyrin-IX-Häm als prosthetische Gruppe. Hämoglobin als Sauerstoff-Träger bei Säugern, Cytochrom P-450 als Hydroxylierungsenzym und Peroxidasen zeigen strukturelle Ähnlichkeit, ihre grundsätzlichen Funktionen sind aber unterschiedlich. Dennoch sind bei einigen Häm-Verbindungen Peroxidase-Aktivitäten festgestellt worden (Dordick & Klibanov, 1986).

Der Begriff Peroxidase umfaßt im weitesten Sinn alle Oxidoreduktasen, die Elektronen von einem reduzierten Substrat auf H_2O_2 übertragen können. Neben den Enzymen, die bezüglich des Elektronendonators festgelegt sind (z.B. GSH-POD), werden im weiteren Sinn alle "universellen" Enzyme als POD bezeichnet:



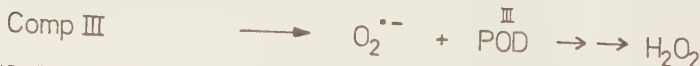


(Halliwell & Rycker, 1978)

Die Gleichungsfolge erklärt die schrittweise (Halliwell & Rycker, 1978) Reduktion des Häm-Proteins, nachdem für die H_2O_2 -Reduktion zunächst 2 e⁻ abgegeben wurden. Daneben scheint POD noch mehrere "ungewöhnliche" katalytische Fähigkeiten zu besitzen. Peroxidase kann in Anwesenheit von mehr oder weniger leicht autoxidierbaren Substraten auch als Oxidase wirken. Mason et al. (1957) konnten Hydroxylierungsreaktionen der POD in Anwesenheit von Dihydroxyfumarsäure feststellen.



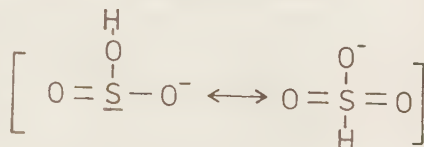
(Sawada & Yamasaki, 1973)



(Rotilio et al., 1975)

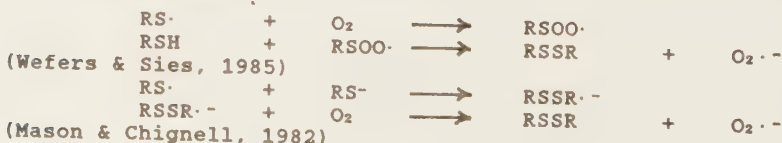
Durch Autoxidation entsteht der eigentliche e⁻-Akzeptor, H_2O_2 , durch das Enzym POD.

Der durch H_2O_2 -Reduktion entstandene Comp. I kann durch Thiole, wie CYS, GSH und auch Bisulfit, das als Thiol aufgefaßt werden kann, schrittweise zur ursprünglichen Ferriperoxidase (III) reduziert werden:



(Harman et al., 1984)

Die dabei entstandenen Thiylradikale sind zur Reduktion von Sauerstoff befähigt:



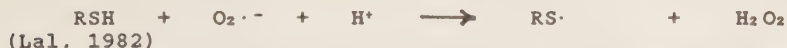
(Wefers & Sies, 1985)

(Mason & Chignell, 1982)

Diese "Thiyl"-Radikale können in geringerem Umfang auch durch Autoxidation entstehen:



H_2O_2 entsteht durch Dismutation von $\text{O}_2^{\cdot -}$, ebenso durch Reaktion der Thiole mit Superoxid:



Daneben sind eine Reihe anderer Thiol-Oxidationsprodukte und reaktiver Sauerstoffspezien berichtet worden (Wefers & Sies, 1983).

Im Gegensatz zur Autoxidation bzw. Peroxidase-Reaktion, bei denen Thiylradikale meßbar sind, wird HSO_3^- durch Sulfit-Oxidase (ein Häm-Protein!) direkt zum Sulfat umgesetzt.

Mason et al. (1983) führt die fatalen Folgen beim Fehlen einer Sulfit-Oxidase im menschlichen Organismus auf diese Peroxidase-induzierte Kaskade von Radikalreaktionen zurück. In dieser Arbeit wurde versucht zu zeigen, wie Thiole an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezien beteiligt sind, welche Möglichkeiten der Detektion bestehen und in welchem Ausmaß Regulationsmechanismen denkbar sind.

Bereits 1953 wurde von Kenten & Mann gezeigt, daß Peroxidasen in Anwesenheit von Mangan²⁺-Ionen und einem p-substituierten Phenol in der Pflanze in der Lage sind, Sauerstoff aufzunehmen und H_2O_2 zu produzieren. Die physiologische Funktion von Mangan wurde in seiner Fähigkeit gesehen, einen Reduktions-/Oxidationszyklus zu bilden.

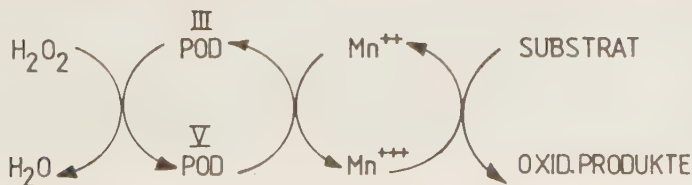
Die oxidative Decarboxylierung von Oxalacetat wird durch Mn^{++} ohne externe H_2O_2 -Zugabe, nach einer Lag-Phase beschleunigt (Krebs, 1942).

Mangan²⁺ ist schwer oxidierbar (Hollemmann & Wiberg, 1985), eine Autoxidation erfolgt somit nicht.

Das entstehende Mn^{+++} ist ein starkes Oxidans und wird auf Kosten unterschiedlichster Reduktionsmittel von der Pflanze sofort reduziert.

Kenten & Mann (1957) zeigten die Existenz von Mangan höherer Oxidationszahl als II in Pflanzen auf und unterstützten somit die Hypothese, daß der Valenzwechsel des Mangans eine Funktion dieses essentiellen Elements sei.

Als Reaktion einer Mangan-abhängigen POD wurde von Glenn et al. (1986) gezeigt: Mangan²⁺-Oxidation erfolgte schneller als die aller anderen Substrate, wobei allerdings H_2O_2 notwendig war.



Der lichtunabhängige Abbau von Chlorophyll durch POD ist hinreichend beschrieben (Kato & Shimizu, 1985). Als Modellsubstanz für die als Schutzpigmente fungierenden Carotine, wurde das gut wasserlösliche Crocin, ein Crocetin-Glycosid, eingesetzt.

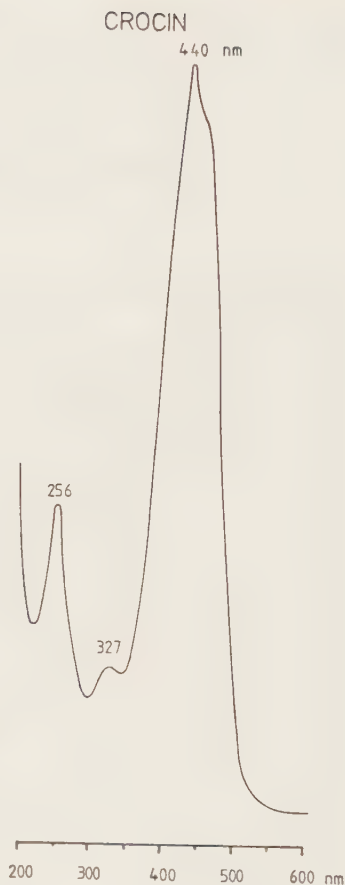


Abb.3: Struktur und UV-Spektrum von Crocin

Neben seiner Funktion als Pigment repräsentiert Crocin auch die Polyenstruktur, eine flexible, tragende Stütze zellulärer Membranen.

Die Zerstörung der Substanz durch reaktive Sauerstoffspezies, über lichtabhängige Prozesse entstanden, wurde berichtet (Youngman, et al. 1983). Bereits 1960 stellten Friend & Mayer die Bedeutung von Sauerstoff für diese Reaktion und ihre Unabhängigkeit von H_2O_2 fest.

Weber & Grosch (1976) beschrieben eine Lipoxygenasereaktion für die Sauerstoff-abhängige Bildung von Fettsäure-Peroxyradikalen, die durch Bildung des Polyenradikals die Bleichung verursachte.

Diese Arbeit beschreibt H_2O_2 -abhängige, aber auch H_2O_2 -unabhängige Peroxidase-Reaktionen sowie ihre Wirkung auf dieses Modellcarotinoid.

Während der Seneszenz oder Fruchtreifung nehmen die Konzentrationen von Cytokinin und Indolelessigsäure ab, gleichzeitig steigt die Aktivität einer IAA-Oxidase an. Frenkel & Dyck (1973) postulierten, daß der endogene IAA-Gehalt einen "Resistenz-Faktor" für die Reifung darstellt und deshalb vorher abgebaut werden muß.

Es ist seit den 50-iger Jahren bekannt, daß Peroxidase zur IAA-Oxidation befähigt ist, sei es mit oder ohne H_2O_2 , phenolischen Komponenten oder Mangan²⁺. Die dazugehörige Literatur ist kaum überschaubar; sehr groß ist auch die Anzahl der isolierten Abbauprodukte.

Die publizierten Ergebnisse beziehen sich sowohl auf in vitro als auch in vivo Experimente.

Seit Beginn der Untersuchungen besteht bereits die Diskussion über die molekulare Struktur einer IAA-Oxidase bzw. die Möglichkeit, daß IAA-Oxidase- und POD-Aktivität auf den selben Molekülen beruhen.

Erschwert wird die Klärung dieser Problematik dadurch, daß eine Vielzahl von Isoenzymen existieren, die beide Reaktionstypen katalysieren können. Die meisten Isoenzyme zeigen POD- und IAA-Oxidase-Aktivität, allerdings in unterschiedlichem Maße; selten wurde eine IAA-Oxidase beschrieben, die keine POD-Aktivität zeigt.

Ricard et al. (1972) schlugen eine interessante Erklärung vor: eine große Anzahl an Proteinen, die mit sinkender Zahl von sauren Gruppen im reaktiven Häm-Zentrum, von Peroxidaseaktivität (sauer) über Sauerstoffaktivierung zum Sauerstoffträger (basisch) ihre Eigenschaft wandeln.

Problematisch ist auch die Aussage über die Lokalisierung der IAA-Oxidase bzw. POD (Schneider & Wightman, 1974). Zum einen wird eine lösliche POD im Cytoplasma diskutiert (Meudt & Stecher, 1972), andere Autoren berichten über Zellwand-, Plasmalemma- oder Tonoplast-assoziiierter POD (Ridge & Osborne, 1970/Whitmore, 1971). In jüngerer Zeit wird auch über IAA-Oxidase Aktivität im Golgiapparat, Lysosomen oder Endoplasmatischen Reticulum berichtet (Waldrum & Davis, 1981); Grob & Matile (1980) extrahierten POD aus Vakuolen.

Es wurden Befunde für einen decarboxylierenden wie auch nicht-decarboxylierenden Abbau-Weg gefunden.

Reinecke und Bandurski (1983) zeigten auf, daß Oxindol-3-essigsäure bei der IAA-Oxidation im Maisendosperm ein möglicher, nicht decarboxylierender IAA-Abbauweg in vivo sein kann.

Ernstsen et al. (1987) wiesen nach, daß Oxindol-3-essigsäure auch in keimenden Samen von Pinus silvestris eine endogene Komponente ist.

Dem steht die Bildung von Indol-3-methanol, als ein durch Decarboxylierung entstandenes IAA-Oxidationsprodukt durch verschiedene Organelle oder Enzym-Rohextrakte (Sundberg et al., 1985 b/Brown et al., 1986/Osswald et al., 1987) gegenüber. Bei Anwesenheit von Phenolen ist Indol-3-Methanol ein Hauptprodukt (Grambow & Langenbeck-S., 1983/Sabater et al., 1983/Wiese & Grambow, 1986).

Sundberg et al. (1985) identifizierten IM als eine endogene Substanz in Pinus silvestris. Auch Ernstsen et al. (1987 b) beschrieb IM als ein IAA-Abbauprodukt in Rhizobium phaseoli-Kulturen, Magnus et al. (1982) im Parasiten Orobanche, was den decarboxylierenden Katabolismus auch in vivo als möglich erscheinen läßt.

Auch die Extraktion von IM-Glucosiden (Wiese & Grambow, 1986) deutet auf eine Beteiligung von IM im IAA-Metabolismus der Pflanze hin.

Neben IM wird Indol-3-aldehyd nach IAA-Applikation in Pflanzensegmenten (Magnus et al., 1971/Stutz, 1958) gebildet.

In dieser Arbeit werden Peroxidase-Reaktionen beschrieben, die durch HSO_3^- und andere Effektoren in ihrer IAA-Oxidase-Aktivität verändert werden.

Das Phytohormon Ethylen reguliert wichtige Prozesse des Pflanzenwachstums und der Entwicklung, wie Fruchtreifung und Seneszenz (Abeles, 1973).

Ethylen wird ebenso während verschiedener Streßsituationen, wie Verletzung, Trockenheit, Nässe oder Infektion (Montalbini & Elstner, 1977) gebildet.

Adams & Yang (1979) identifizieren ACC als den Ethylen-Vorläufer bei der Ethylenbiosynthese in Äpfeln. Die gebildete Ethylenmenge steht mit der ACC-Konzentration in direktem Bezug. Die folgenden Schritte scheinen gesichert: MET - SAM - ACC - Ethylen (Lürsen et al., 1979/Yang & Hoffmann, 1984). Der limitierende Schritt ist die Bildung von ACC durch ACC-Synthase. Dieses Enzym wird nach Verletzung des Pflanzengewebes (Boller & Kende, 1980/Hyodo et al., 1983), durch IAA (Yoshii & Imaseki, 1981) oder durch Elicitoren von Pilzen (Chappell et al., 1984) induziert.

Viele Arbeiten sind über die Isolierung und Charakterisierung des Ethylen-bildenden Enzyms, das zur ACC-Oxidation befähigt ist, erschienen (Konze & Kende, 1979/Konze & Kwiatkowski, 1981/Rohwer & Mäder, 1981/Shimokawa, 1983).

Bis heute ist der letzte Schritt der Ethylenbildung, sei es durch ein oder mehrere Enzyme mit den entsprechenden Cofaktoren, nicht restlos aufgeklärt.

Das Bestreben dieser Arbeit war es, ein Modellsystem mit minimaler Anzahl von Komponenten zu entwickeln, das zur Klärung der Ethylen-Synthese in vivo beitragen könnte.

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien

Boehringer (Mannheim): Katalase, Peroxidase, Xanthin-Oxidase
Serva (Heidelberg): Diaphorase (Clostridium kluveri),
Picein
Sigma (München): alle anderen Enzyme und Feinchemi-
kalien
Merck (Darmstadt): Säulenmaterial, DC-Platten und alle
Lösungsmittel

Geräte

Spektralphotometer: Kontron Uvikon 810 mit Schreiber und
Printer
HPLC-Anlage, Beckmann: 2-Wellenlängendetektor (163),
2 Pumpen (114), Organizer (340),
Controller (420), Printer (C-R2AX)
Waters: Photodioden-Array-Detektor (990)
ECR-Säule: 5 µm, 4x125 mm, Hypersil-ODS
Gas-Chromatograph: Varian (1400), Integrator (CDS 101),
Al₂O₃-Säule: 2' x 1/8", Säulentempe-
ratur 60° C, Detektortemperatur 210°C
Hansatech, Typ Clark
Sauerstoffelektrode: Perkin Elmer (KBr)
IR-Spektrometer: Brucker 200 MHz (CDCl₃)
¹H-NMR-Spektrometer: Kontron 60 MHz (CDCl₃)
¹³C-NMR-Spektrometer:

Organismen

Picea abies (L.) Karst: Bayrischer Wald (Dreisessel), Maxhof
(bei München)
Rhizosphaera kalkhoffii bubak, Siroccus Typ II
Lophodermium piceae (Prof. Butin, Institut für Pflanzen-
schutz im Forst, Braunschweig)
Cladosporium cucumerinum (Prof. Zinkernagel, Phytopatho-
logisches Institut, TU-München-Weihenstephan)

Methoden

Aufarbeitung des Nadelmaterials und Anzucht der Pathogene
unter Ergebnisse A.5.1.

1. Gaschromatographische Ethylenbestimmung

Der 2 ml Reaktionsansatz erfolgte in Fernbach-Gläsern mit
gasdichten Gummistopfen. Aus den 10 ml Gasvolumen wurde
nach Beendigung der Reaktion 1 ml entnommen und in den
Gaschromatographen injiziert:

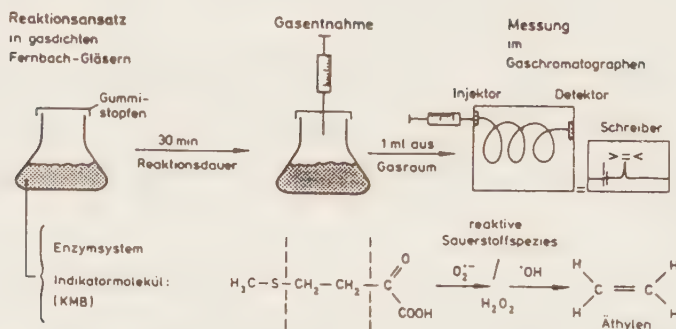


Abb.4: Versuchsdurchführung der enzymatischen Modellreaktionen unter Ethylenbildung

2. Crocin-Bleichungsansatz

Crocin wurde aus Safran (örtlicher Handel) gewonnen. Lipide konnten im Soxhlet-Apparat durch kontinuierliche Ether-Extraktion entfernt werden. Crocin wurde mit Methanol aufgenommen und anschließend mit Wasser verdünnt (Friend & Mayer, 1960). Dieser Crocin-Rohextrakt war bei -80°C über einige Tage haltbar.

Molarer Extinktionskoeffizient: $1.34 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
(Bors et al., 1984)

$E_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$

Testansatz:

Phosphatpuffer	100 mM
H ₂ O	ad 2 ml
Substrat	0,5 mM
Crocin	10 µM

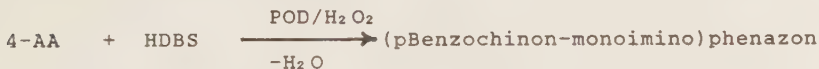
Gestartet wurde mit 10 U Peroxidase. Ein automatischer Küvettenwechsler konnte pro Minute je 1 Meßwert erfassen.

3. Messung des Sauerstoff-Umsatzes

2 ml gut belüfteter Phosphatpuffer (100 mM) wurde in der Meßzelle der Sauerstoffelektrode auf 25°C temperiert; bei optimaler Sauerstoffsättigung: 506 nmol O₂/2 ml Ansatz. Die Überprüfung der Funktionstüchtigkeit erfolgte durch restlose Reduktion des gelösten Sauerstoffs mit Dithionit. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in Aliquots von 100 µl zugegeben.

4. Messung gebildeter Peroxide (Artiss et al., 1980/ Sedewitz et al., 1983)

4-Aminoantipyrin (4-AA) und 2-Hydroxy-3,5-dichlorobenzoesulfonsäure (HDBS) werden in Anwesenheit von H_2O_2 , aber auch organischen Peroxiden (Vogl, 1987), durch Peroxidase zu einem Phenazon oxidiert.



Das gebildete Phenazon ist der H_2O_2 -Konzentration, seine Bildungsrate auch der POD-Aktivität, proportional und kann bei 510 nm detektiert werden.

2 ml Ansatz:	Phosphatpuffer	50 mM
	HDBS	7 mM
	4-AA	2 mM
	HRP	10 U
	Peroxidlösung	
	H_2O	ad 2 ml
	Farbbildung	20 Minuten

5. HPLC-Trennung

5 μ l Injektionsvolumen aus dem jeweiligen Testansatz (konst. Temperatur 22°C) wurden nach hochtourigem Abzentrifugieren getrennt.

mobile Phase A: 40 % MeOH/60 % H_2O (0,2 % Eisessig)
mobile Phase B: 80 % MeOH/20 % H_2O (0,2 % Eisessig)

Trennung der IAA-Abbauprodukte:

isokratisch, Phase A
Fluß: 1 ml/min; 280 nm

Trennung der Crocin-Abbauprodukte:

0 -10 min.: Phase A
10-15 min.: Phase A - Phase B
15-25 min.: Phase B
Fluß: 1 ml/min;
Detektion : 280, 436 nm

6. Ellman's Test (1959)

Der modifizierte SH-Gruppennachweis ist unter Ergebnisse B.2.2. beschrieben.

7. Oxidation von Hydroxylamin (Elstner & Heupel, 1976)

Durch Oxidation vom Typ des Superoxidanions wird Hydroxylamin zum Nitrit oxidiert.

Reaktionsansatz: Phosphatpuffer 100 mM
NH₂OH 0,5 mM
Testsystem
H₂O ad 2 ml
Reaktionszeit 30 min.

anschließende Zugabe:

500 µl Sulfanilamid (1 %, HCl-sauer)
500 µl Naphtylethyldiamin (0,02 %);

nach 20 Minuten wird bei 540 nm der für Nitrit spezifische Farbstoff gemessen.

ERGEBNISSE

1. Isolierung und Charakterisierung von p-Hydroxyacetophenon aus Fichtennadeln

1.1. Isolierung aus Fichtennadeln

Bevor Struktur und Bedeutung von pHAP aufgeklärt waren, galt das Interesse der Isolierung von Substanzen aus Fichtennadeln, die fungitoxische Eigenschaften zeigen.

Dazu wurden ganze Nadeln mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln (MeOH/ CHCl₃/ Hexan) 30 Minuten unter schütteln inkubiert. Die gefilterten Extrakte wurden nach starker Konzentrierung auf Kieselgel-DC-Platten aufgetragen und dem Biotest unterzogen.

1.1.1. Biotest auf fungitoxische Eigenschaft

Als Testorganismus diente der Pilz Cladosporium cucumerinum (Gurkenrost). Er wurde in einem Agar-(0,3 %), Biomalt-(0,1%) und Streptomycin- (0,01 %) Medium kultiviert. Nach einem 20-tägigen Wachstum bei 26° C wurden die Sporen geerntet und in einer Test-Lösung mit 2 % Malzextrakt, 2 % Glucose, 0,01 % Streptomycin und 0,1 % Tween 20 suspendiert. Die Sporendichte wurde mit einer Thomae-Kammer auf ca. $1,5 \times 10^6$ Sporen/ml eingestellt.

Die steril aufgetragenen Rohextrakte ergaben auf der DC-Platte Kreise mit ca. 2 cm Durchmesser.

Nach Besprühen der Platten mit der Pilzsuspension wurde bei 26° C und maximaler Luftfeuchtigkeit bebrütet.

An der Stelle des CHCl₃-Extraktes auf der DC-Platte war ein weißer Hemmhof; an allen anderen Stellen waren die dunklen Mycelien des Pilzes sichtbar.

Die MeOH- bzw. Hexan-Extrakte wiesen keine Hemmung des Pilzwachstums auf.

Der Rohextrakt (wie auch die Reinsubstanz) zeigte auch gegen pilzliche Forstpathogene Hemmung deren Wachstum:

Rhizospheara kalkhoffi bubak

Sirococcus Typ II

Lophodermium piceae

Neben Cladosporium c. wurde auch der dunkel gefärbte Rhizosphaera k.b. zur weiteren Untersuchung der fungitoxischen Eigenschaften herangezogen. Der Pilz war bei niedrigen Temperaturen (18° C) in 3 % Malzin-Lösung kultivierbar.

1.1.2. Dünnschichtchromatographische Trennung

Der Rohextrakt wurde auf DC-Platte (Kieselgel-60 mit Konzentrierungszone) und mit Petrolether/Essigester (6:4) als mobiler Phase getrennt. Nach 2-maliger Entwicklung und Trocknung war unter UV-Licht (254 nm) folgendes sichtbar:

dunkle Bande	Rf = 0,44
fluoreszierende Bande	Rf = 0,33

Die dunkel erscheinende Bande war im Biotest fungitoxisch; die fluoreszierende Bande zeigte keinen Einfluß auf das Pilzwachstum.

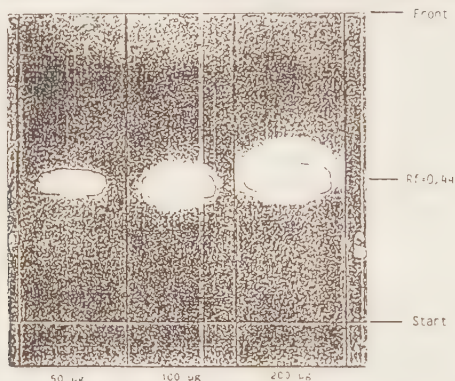


Abb.5: Biotest mit Cladosporium cucumerinum bei unterschiedlicher pHAP-Konzentration

1.1.3. Säulenchromatographische Trennung

Für die Aufklärung der Struktur wurde von 175 g Nadeln (Maxhof, 1985) ausgegangen.

Zur Abtrennung der lipophilen Bestandteile der Nadeloberfläche wurden die ganzen Nadeln ca. 15 Min. mit Aceton in einer Soxhlett-Apparatur extrahiert.

Die von kutikulären Bestandteilen befreiten Nadeln wurden in flüssigem Stickstoff feinst pulverisiert und anschließend mit Chloroform wiederholt extrahiert. Der CHCl_3 Extrakt wurde filtriert und über Nacht mit Na_2SO_4 getrocknet.

Durch Übersichtung mit Petrolether konnte ein amorphkristalliner Feststoff erhalten werden, der geringere Färbung als der Überstand zeigte.

Die abgetrennten und mit Petrolether gewaschenen Kristalle wurden in wenig CHCl_3 aufgenommen und auf eine in MeOH gepackte Kieselgel-60-Säule (30 x 1,5 cm) gegeben.

Zur Trennung diente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}_2$ (10: 5: 1) als mobile Phase.

Die 200-Tropfen-Fractionen wurden gesammelt und auf einer DC-Platte getrennt.

Die Fractionen 17- 21 enthielten die größten dunklen Bereiche mit $R_f = 0,44$, was eine spätere HPLC-Trennung bestätigte.

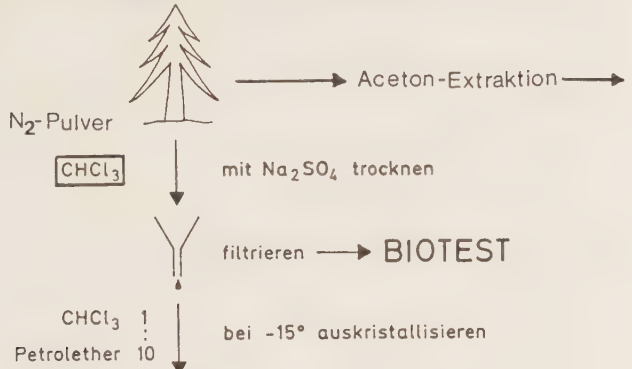
Fraktion 17- 21 war leicht grünlich gefärbt; die Fractionen davor deutlicher gelb, die später folgenden grün.

Es erfolgte noch eine weitere Umkristallisierung in Petrolether/ CHCl_3 und anschließend in heißem H_2O .

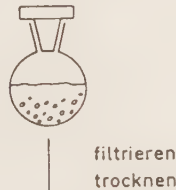
Als Ausbeute wurden 35 mg weiße Kristalle erhalten.

Abb.6 : Isolierung von pHAP aus Fichtennadeln

EXTRAKTION

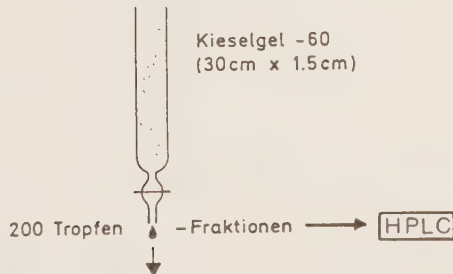


I. UMKRISTALLISATION

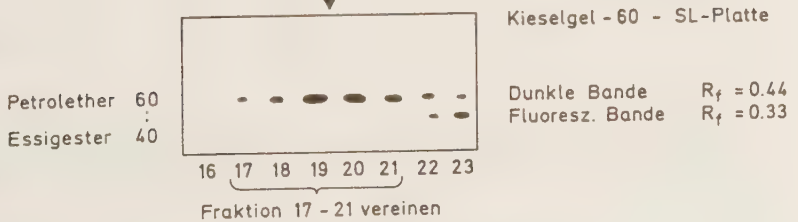


TRENNUNG

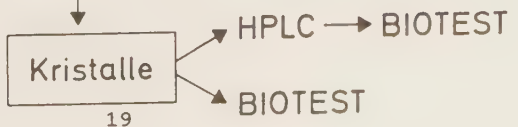
$CHCl_3$ 10
:
 $MeOH$ 5
:
 H_2O 1



TEST



II. UMKRISTALLISATION



1.1.4. HPLC-Trennung eines Rohextraktes

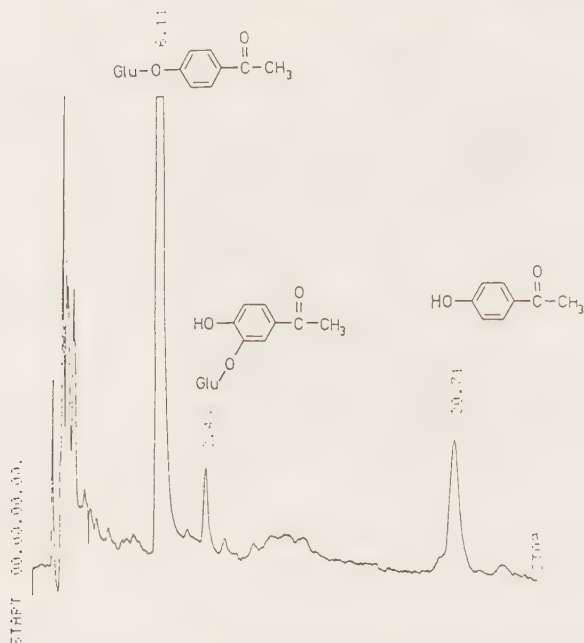


Abb.7: Chromatogramm eines Phenol-Rohextraktes aus Fichtennadeln

Säule : Spherisorb 5 μ M
 mobile Phase: H₂O/MeOH (80: 20)
 Detektion : 280 nm (range: 0.005)

Für Routineuntersuchungen war eine erheblich kürzere Proben-
aufarbeitung nötig; zudem war eine Umgehung des für HPLC-
Trennung problematischen CHCl₃ erforderlichlich.

Die nicht aufgetauten Proben wurden sofort mit flüssigem
Stickstoff fein pulverisiert, wiederholt mit Ethylacetat/iso-
Propanol (1: 1) extrahiert, filtriert und abrotiert.

Anschließend wurden diese in MeOH wieder aufgenommen und mit
H₂O auf ein genormtes Volumen eingestellt. Diese Lösung konn-
te nach hochtourigem Abzentrifugieren getrennt werden.

Die polaren Glucoside Picein und (falls vorhanden) Punginin
erschieneen erheblich früher als das Aglycon pHPAP im Chroma-
togramm.

Die Werte für Picein und pHPAP unterlagen einer erheblichen
Schwankungsbreite (bei gleichem Standort, Alter und Zustand
der Bäume):

Picein	5 - 15	g/TG
pHPAP	0,1 - 0,6	g/TG

Für pHAP ergab sich daraus in der frischen Nadel (bei angenommener gleichmäßiger Verteilung) eine Konzentration von ≈ 8 mM. Pilzhemmung setzte bereits bei Konzentrationen ≈ 1 mM pHAP ein.

Zu Beginn der Aufarbeitung mußte jegliches Auftauen vermieden werden, um die Spaltung der glucosidischen Bindung von Picein durch Cellulase zu vermeiden.

Das bei der "größentechnischen" Aufbereitung durch Aceton-Extraktion verworfene Lipid enthielt größere Mengen an pHAP.

pHAP-Nadeloberfläche: $\approx 50 \mu\text{g/gTG}$

Dennoch war der Gesamt-pHAP-Gehalt erheblich höher, so daß der Verlust gerechtfertigt erschien.

1.2. Strukturaufklärung

1.2.1. ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum

Das Protonen-NMR-Spektrum zeigt ein Singulett mit drei Protonen im aliphatischen Bereich bei stark elektronegativen Nachbargruppen.

Das "Quartett" im aromatischen Bereich mit den schwachen Banden neben den vier Hauptsignalen deutet paradisubstituiertes Benzol an; ebenso wie die Kopplungskonstanten von 8,75 Hz. Das Singulett mit einem Proton erscheint bei einer chemischen Verschiebung von 6,53, durch H-Brückenbindungen stark verbreitert und zu tiefem Feld verschoben.

^1H -NMR (200 MHz/ CDCl_3 / TMS-Standard)

δ	2,58	(3 H, s)
	6,53	(1 H, s)
	6,91	(2 H, d, J A,B = 8,75 Hz)
	7,91	(2 H, d, J A,B = 8,75 Hz)

Das Breitband-entkoppelte ^{13}C -NMR-Spektrum (200 MHz, CDCl_3) läßt eine eindeutige Zuordnung der chemischen Verschiebungen und Signalintensitäten zu.

Abb. 8: ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Substanz

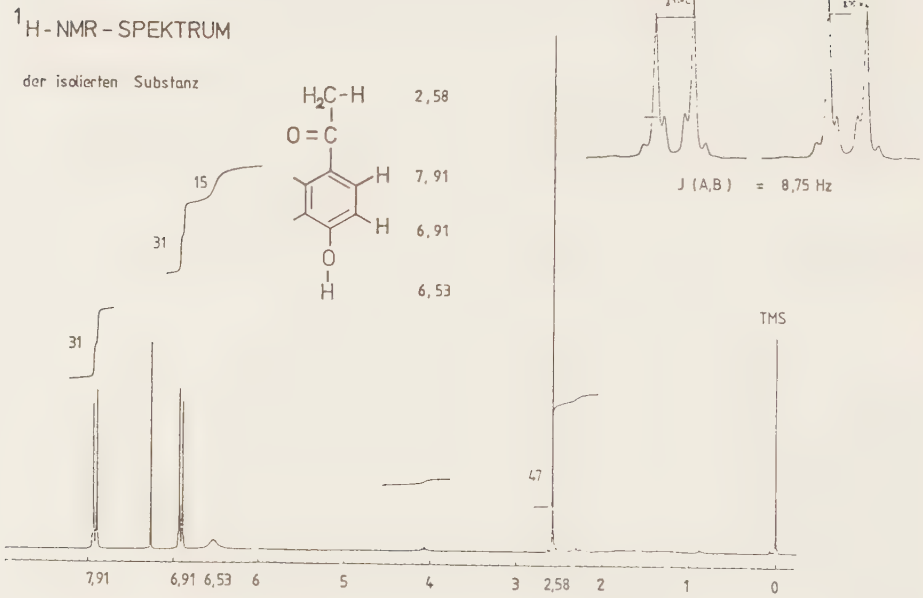
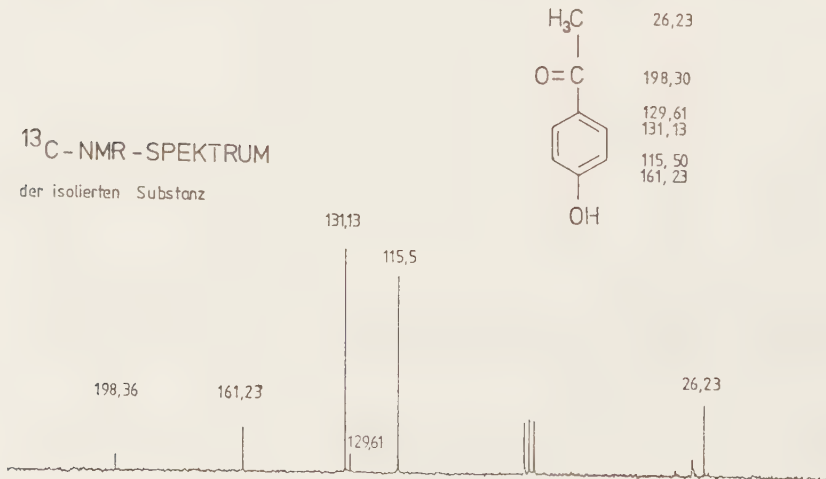


Abb. 9: ^{13}C -NMR-Spektrum der isolierten Substanz



1.2.2. IR-Spektrum

Zur weiteren Charakterisierung von pHAP wurden die Informationen des IR-Spektrums herangezogen:

Wellenzahl KBr cm^{-1}	zugeordnete Schwingung
3300	O - H
3130	aromatische C - H
1650	C = O
1510	aromatische C = C
1580	aromatische C = C
840	1,4-disubst. Aromat

Tab.1: IR-Banden von pHAP

Die isolierte Substanz und käufliches pHAP zeigten identische Absorptionsbanden.

1.2.3. UV-Spektrum

269nm



Das UV-Spektrum wurde in Ethanol und in Wasser aufgenommen:

EtOH = 277
H₂O = 269

Es zeigt einen sehr scharfen Peak bei 270 nm. Isoliertes und käufliches pHAP zeigten identische UV-Spektren.

Abb.10: UV-Spektrum von pHAP

1.2.4. Mischschmelzpunkt

Die extrahierte Substanz wurde mit käuflichem pHAP (nach 2-maliger Umkristallisation) verglichen:

Substanz	Schmelzpunkt ° C
pHAP (isoliert)	107
pHAP (käuflich)	107
Mischung 1: 1	108

Tab.2: Schmelzpunkte von isoliertem und käuflichem pHAP

Der kaum über den zu vergleichenden Komponenten liegende Mischschmelzpunkt deutet auf eine Reinsubstanz hin.

1.2.5. HPLC-Cochromatographie

Der Vergleich des Rohextraktes aus Fichtennadeln mit käuflichem (und gereinigtem) pHAP bei identischen HPLC-Bedingungen ergab die gleiche Retentionszeit (siehe 1.1.)
Eine Mischung von käuflichem und isoliertem pHAP ergab nur einen peak bei 20 Minuten.

1.2.6. Vergleichender Bio-Test

Verschiedene Konzentrationen (10, 50, 100, 200 µg/100 µl) von sowohl isoliertem als auch käuflichem pHAP wurden vergleichend auf DC-Platte aufgetragen (100 µl) und getrennt (CHCl₃/Ethylacetat/MeOH = 5: 4: 1). Es ergab sich für beide eine dunkle Bande mit R_f = 0,58. Nach Durchführung des Bio-Testes wurden die Hemmhöfe ausgemessen und verglichen:

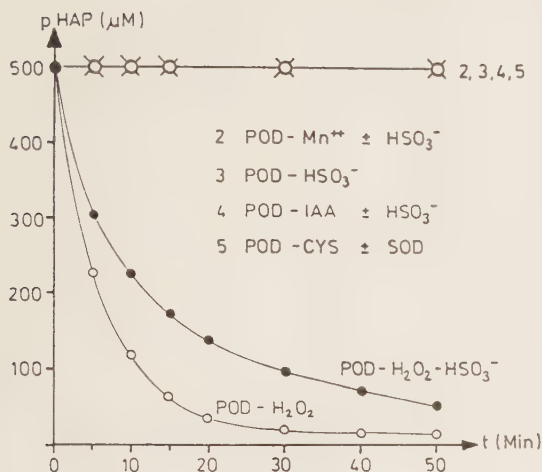
µg pHAP in jeweils 100 µl CHCl ₃	Hemmhöfe gegenüber Cladosporium cucum.	
	pHAP - käuflich	pHAP - isoliert
10	—	—
50	3,2	2,4
100	7,3	7,9
200	12,0	16,0

Tab.3: Hemmstoffvergleich von käuflichem und isoliertem pHAP.

Die isolierte Substanz konnte somit bezüglich jedes Merkmals eindeutig als pHydroxyacetophenon identifiziert werden.

1.3. Quantifizierung von pHAP in verschiedenen Modellsystemen

1.3.1. POD-katalysierter pHAP-Abbau: Detektion durch HPLC



Ansatz/2 ml:

Phosphatpuffer	100 mM
pH = 7,8	
POD	10 U
H ₂ O ₂	0,5 mM
HSO ₃ ⁻	50 μM
Mn ²⁺	50 μM
IAA	0,5 mM
CYS	0,5 mM
SOD	100 U
pHAP	0,5 mM
Reaktionszeit:	30 min.

Trennung:

Säule:	Hypersil 5 μM/ 125 x 4 min.
Laufmittel:	40 % MeOH 20 % H ₂ O flow: 1 ml/min.
	280 nm/range 0,1

Abb.11: pHAP-Abbau in verschiedenen POD-Systemen

Obiges Diagramm zeigt ein wichtiges Modellsystem, das später genauer bezüglich der pHAP-Konzentration während der Reaktion untersucht wird.

Sämtliche peroxidatischen Systeme, in denen kein H₂O₂ als Substrat von POD auftritt, sind nicht zum Abbau des Phenols befähigt!

Das System POD-H₂O₂ baut pHAP innerhalb von 30 Minuten quantitativ ab.

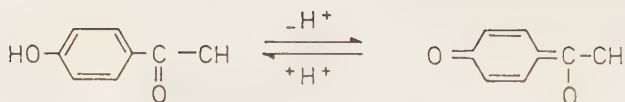
Durch Zugabe von HSO₃⁻ wird der Abbau verlangsamt.

1.3.2. Spektralphotometrischer Test

Folgende Darstellung zeigt die pH-Abhängigkeit der Absorptionsmaxima von pHydroxyacetophenon. Im sauren Bereich liegt pHAP 100 % in protonierter Form vor: max. = 279 nm.

Mit steigendem pH-Wert nimmt die chinoid Struktur anteilmäßig zu. Bei pH = 9,0 läßt sich nur noch das 323 nm Maximum messen.

Bei dem physiologischen pH von 7,8 ist OD 270 nm = OD 323 nm.



Ansatz (2 ml):

P-Puffer	100 mM
H ₂ O	ad 2 ml
pHAP	50 µM

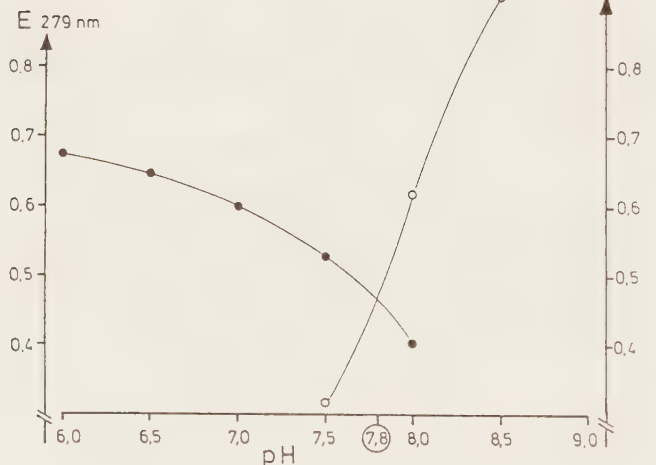


Abb.12: pH-abhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums von pHAP

1.3.2.2. System: POD - H₂O₂

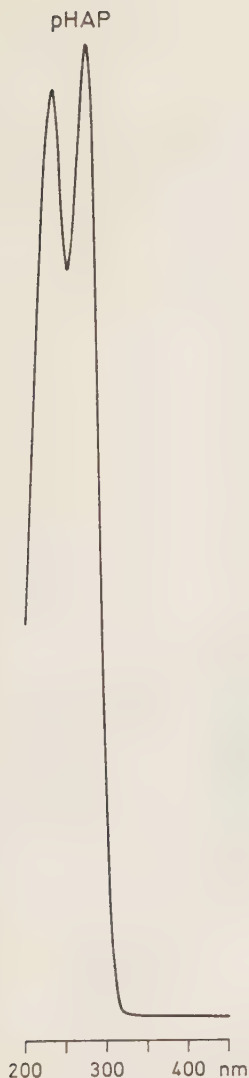
Das Spektrum von pHAP bei pH = 7,8 zeigt die zwei Maxima (279/323 nm). Durch H₂O₂ - bzw. POD-Zugabe erfolgt kein Abbau, erst bei der Kombination POD-H₂O₂. Innerhalb von 30 Minuten ist pHAP vollständig abgebaut.

Anmerkung: Der 280 nm-peak der POD liegt unter dem von pHAP "verborgen"; daher der scheinbar "asymmetrische Abbau".

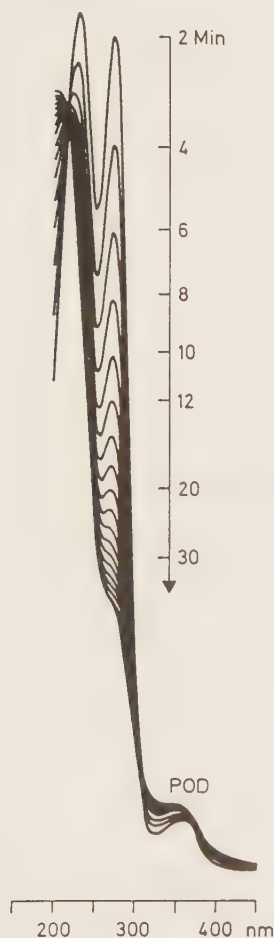
Ansatz/2 ml:

Phosphatpuffer	100 ml
pH = 7,8	
POD	10 U
H ₂ O ₂	0,5 mM
E ₃₂₃	= 0,5

Abb.13: Spektrum von pHAP und Abbau durch POD / H₂O₂



pHAP + POD + H₂O₂



1.3.2.3. POD-H₂O₂-Ascorbat

Das Gemisch aus pHAP und Ascorbat zeigt zwei peaks:
Das 2. pHAP-Maximum bei 323 nm sowie den von Asc deutlich überlagerten pHAP-peak bei 279 nm.

Durch POD-H₂O₂ erfolgt ein sehr rascher Asc-Abbau; erst nach vollständigem Verschwinden von Asc wird pHAP abgebaut.
Die Soret-Bande von POD verschwindet ebenfalls.
Durch H₂O₂ allein erfolgt ein Abbau von Ascorbat, aber kein pHAP-Angriff.

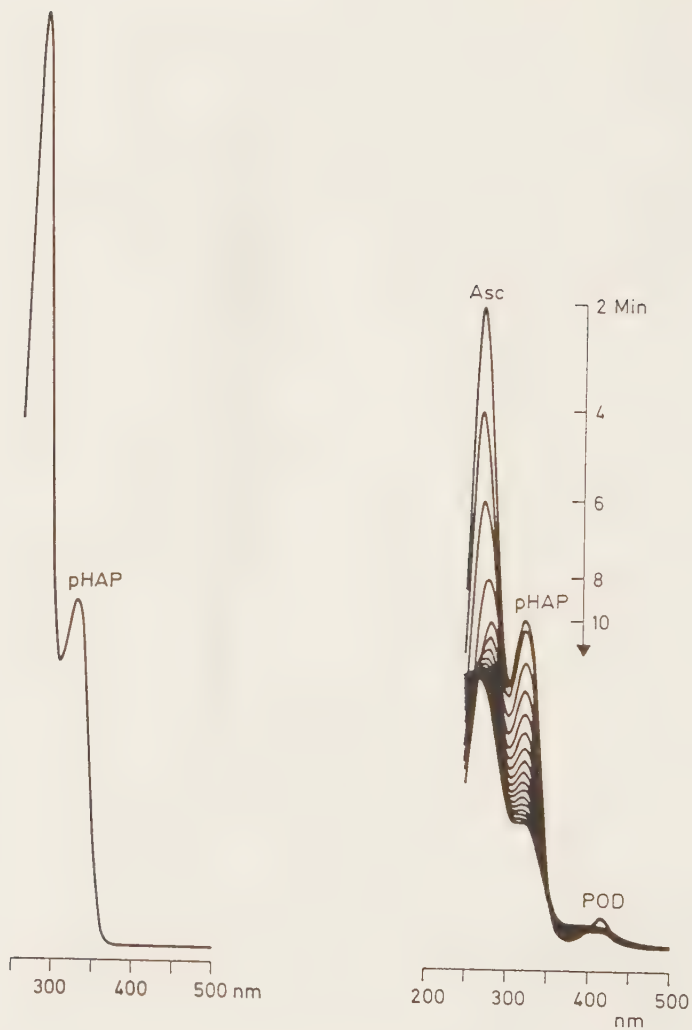


Abb.14: pHAP- und Asc-Abbau durch POD und H_2O_2

Ansatz/2 ml: Phosphatpuffer 100 mM
 pH = 7,8
 POD 10 U
 H_2O_2 0,5 mM
 pHAP 50 μ M
 Ascorbat 50 μ M
 $E_{323} = 0,48$
 $E_{265} = 1,2$

2. Peroxidase Katalysierte Reaktionen

2.1. Ethylen-Bildung aus KMB - ACC - MET

2.1.1. KMB-Spaltung: POD - H₂O₂ - System

2.1.1.1. pHAP-Verstärkung

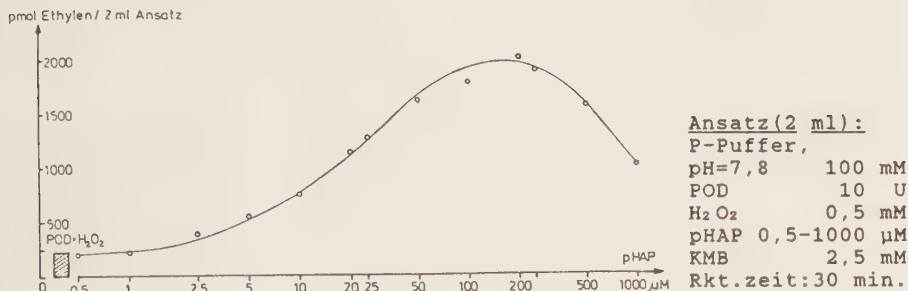
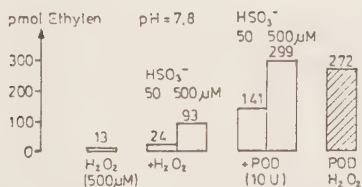


Abb. 15: pHAP-Einfluß auf die KMB-Spaltung durch POD-H₂O₂

Die Grundreaktion Peroxidase - H₂O₂ ist zu geringer Ethylenbildung befähigt: (Grundwerte schwanken - Vergleich nur in einem Reaktionsansatz sinnvoll) Durchschnitt von 20 Werten: 272 pmol.

Durch das Phenol pHAP zeigt sich eine deutlich konzentrationsabhängige Stimulation mit einem Anstieg zwischen 5-50 µM. Im Bereich zwischen 50-500 µM liegt ein Optimum, darüber hinaus sinkt der stimulierende Effekt ab.

2.1.1.2. Einfluß von Bisulfit



Tab. 4: Grundraten

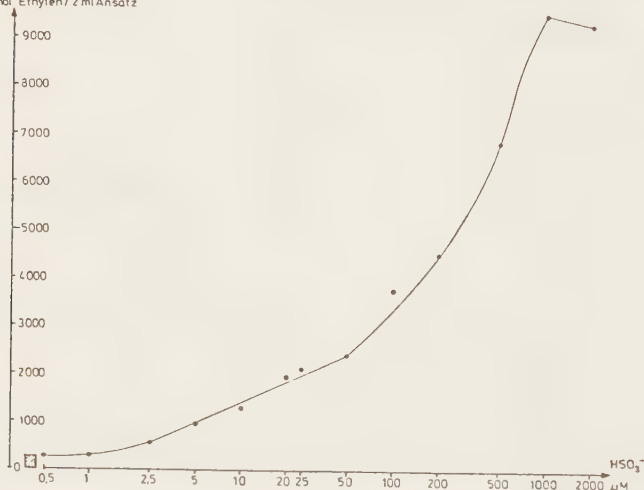
Bei den Grundraten für die Sulfit-stimulierte POD-H₂O₂-bedingte KMB-Spaltung ist folgendes festzustellen:

Selbst die hohe Konzentration an H₂O₂ zeigt kaum Ethylenfreisetzung. H₂O₂ in Anwesenheit von Bisulfit zeigt bei hohen HSO₃⁻-Konzentrationen meßbare Ethylenmengen. Ebenso ist das H₂O₂-unabhängige System POD-HSO₃⁻, HSO₃⁻-konzentrationsabhängig in der Lage KMB zu spalten.

Gleiche Konzentration an H₂O₂ und HSO₃⁻ zeigen ähnlich hohe Werte bei POD-Anwesenheit.

Ab $2,5 \mu\text{M}$ HSO_3^- setzt eine Stimulation des Systems $\text{POD-H}_2\text{O}_2$ ein; ab $50 \mu\text{M}$ bis 1 mM wird der langsame Anstieg deutlicher. HSO_3^- -Konzentrationen über 1 mM führen zu keinem weiteren Anstieg.

pmol Ethylen / 2 ml Ansatz



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 H_2O_2 0,5 mM
 HSO_3^- 0,5-2000 mM
 KMB 2,5 mM
 Rkt.zeit: 30 min.

Abb. 16: Sulfit-Einfluß auf die KMB-Spaltung durch $\text{POD-H}_2\text{O}_2$

2.1.1.3. Synergistischer Effekt von pHAP und HSO_3^- auf die KMB-Spaltung durch $\text{POD-H}_2\text{O}_2$

pmol Ethylen / 2 ml Ansatz		Konzentration von pHAP bzw. HSO_3^-	
		5 μM	50 μM
POD - H_2O_2	279		
↓			
10U			
↓			
500 μM			
↓			
+ HSO_3^-		965	2718
+ pHAP		563	2713
+ HSO_3^- + pHAP		4356	24225

Tab. 5: Synergismus von pHAP und Sulfit im $\text{POD-H}_2\text{O}_2$ -System

Folgende Darstellung zeigt den Konzentrationseinfluß von HSO_3^- zum einen auf die bekannte Grundreaktion $\text{POD-H}_2\text{O}_2$, zum anderen auf die pHAP-stimulierte Reaktion. Der HSO_3^- -Einfluß auf die Grundreaktion liegt im langsamen Anstiegsbereich. Bei Anwesenheit von nur $5 \mu\text{M}$ pHAP zeigt sich mit steigender HSO_3^- -Konzentration ein deutlich überadditiver Effekt; dieser wird nochmals durch Erhöhung beider Konzentrationen extrem verstärkt.

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,

pH = 7,8

H_2O_2 100 mM

HSO_3^- 0,5 mM

POD 10 U

pHAP 5 μM

Reaktionszeit: 30 min.

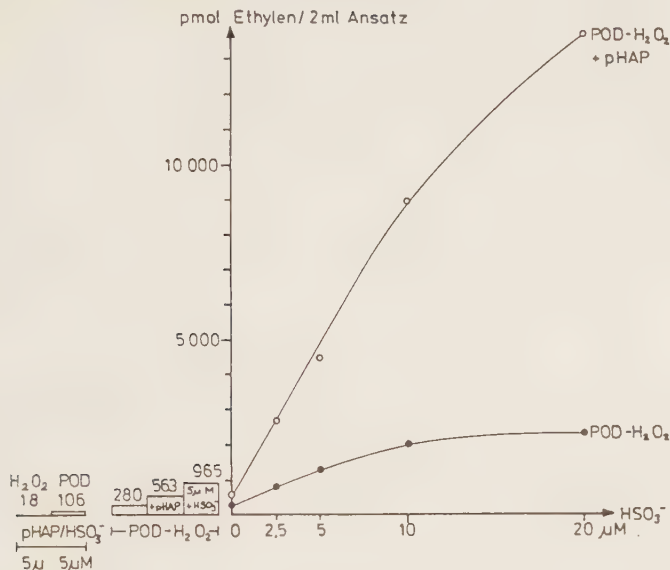
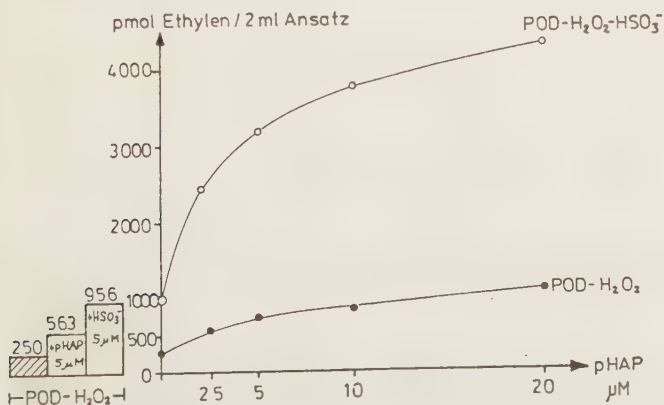


Abb.17: Synergismus von pHAP und HSO_3^- auf KMB-Spaltung durch $\text{POD-H}_2\text{O}_2$



Ansatz (2 ml):

P-Puffer,

pH = 7,8 100 mM

POD 10 U

H_2O_2 0,5 mM

pHAP 5 μM

HSO_3^- 5-20 μM

KMB 2,5 mM

Rkt.zeit: 30 min.

Abb.18: Effekt steigender pHAP-Konzentrationen im System $\text{POD-H}_2\text{O}_2 \pm \text{HSO}_3^-$

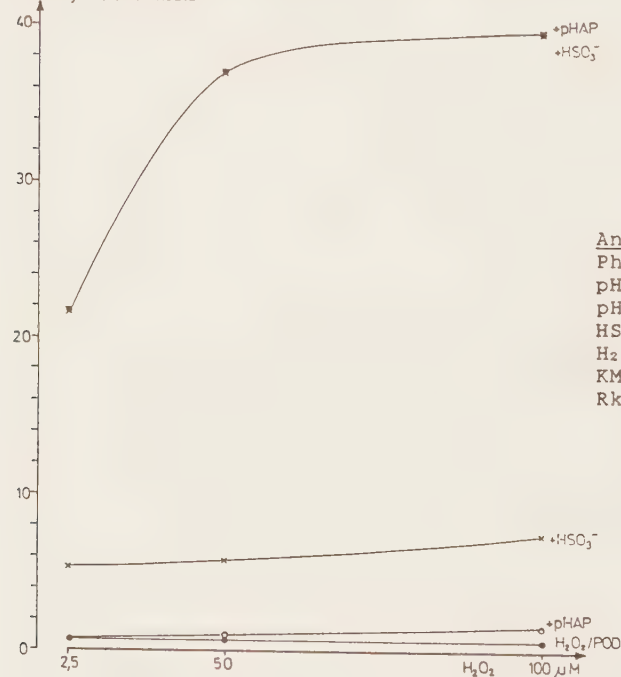
Zur bekannten Stimulation durch steigende Konzentrationen pHAP auf die Reaktion $\text{POD-H}_2\text{O}_2$ kommt ein ebenfalls stimulierender Effekt durch Bisulfit hinzu.

Entgegen der Erwartung handelt es sich hier um einen überadditiven Effekt: mit steigender pHAP-Konzentration wird die über den rein additiven HSO_3^- -Einfluß hinausgehende Ethylen-Bildung erhöht.

Allerdings ist dieser Synergismus nicht ganz so drastisch, wie bei umgekehrter pHAP-Konstanz (μM) und HSO_3^- -Erhöhung.

Bei gleichen Bedingungen ist bei pHAP bereits bei geringer Konzentration ein Sättigungseffekt erreicht.

nmol Ethylen / 2 ml Ansatz



Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,	
pH = 7,8	100 mM
pHAP	50 μM
HSO_3^-	50 μM
H_2O_2	25-100 μM
KMB	2,5 mM
Rkt.zeit:	30 min.

Abb. 19 : H_2O_2 -Einfluß im POD-System ($\pm$ Sulfit/ $\pm$ pHAP)

Deutlich wird der überadditive Effekt bei einer Absenkung der H_2O_2 -Konzentration: H_2O_2 -Erhöhung wirkt sich auf die Grundreaktion nicht, auf die pHAP-verstärkte nur in geringem Maße, aus.

Auf die Sulfit-stimulierte Reaktion hat die H_2O_2 -Erhöhung nur einen geringen Einfluß (sehr hohe H_2O_2 -Konzentration hemmen diese Reaktion, während sie pHAP-Einfluß weiter steigern).

Auffallend wird dagegen der Einfluß auf die Reaktion $\text{POD-H}_2\text{O}_2 + \text{pHAP} + \text{HSO}_3^-$.

2.1.1.4. Hemmstoffeinfluß: SOD und Mannit

System	pmol Ethylen/ 2 ml Ansatz	+ SOD	+ Mannit
POD - H ₂ O ₂	402	254	393
POD - H ₂ O ₂ + pHAP	1833	2095	1970
POD - H ₂ O ₂ + HSO ₃ ⁻	4323	4067	3907
POD - H ₂ O ₂ + pHAP + HSO ₃ ⁻	31810	26302	31676

Ansatz (2 ml):

P-Puffer,	
pH = 7,8	100 mM
POD	10 U
H ₂ O ₂	0,5 mM
pHAP	50 µM
HSO ₃ ⁻	50 µM
Mannit	2,5 mM
SOD	100 U
KMB	2,5 mM
Rkt.zeit:	30 min.

Tab.6: Wirkung von Hemmstoffen im System POD-H₂O₂ ± pHAP ± HSO₃⁻

Der ·OH-Radikalfänger Mannit zeigt weder im Grund- noch in einem der pHAP- bzw. ± HSO₃⁻-verstärkten Systeme einen Effekt. Superoxidismutase hemmt das Grundsystem um 37 % bei 100 U (56 % Hemmung bei 200 U). Auf die übrigen Systeme ist kein Einfluß zu beobachten.

2.1.2. Das Peroxidase - Mangan - System

2.1.2.1. KMB-Spaltung durch POD-Mn⁺⁺

Das für eine Reihe von POD-Wirkungen als nötig postulierte Mangan⁺⁺-Ion ist mit POD in der Lage, H₂O₂-unabhängig KMB zu spalten.

System	p mol Ethylen / 2 ml Ansatz
POD (10U/2 ml)	0
Mn ⁺⁺ (50 µM)	8
POD - Mn ⁺⁺	151
↓ ↓	
+ pHAP (50 µM)	2988
+ HSO ₃ ⁻ (50 µM)	11220
+ pHAP + HSO ₃ ⁻	23475

<u>Ansatz:</u>	Phosphatpuffer, pH 7.8	100 mM
	KMB	2.5 mM

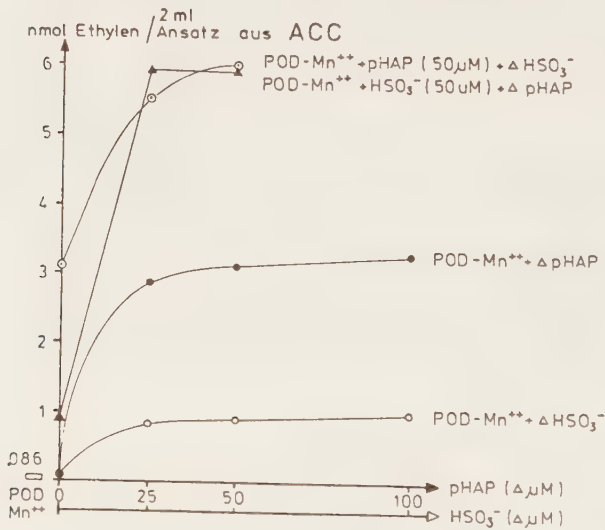
Reaktionszeit: 30 Minuten (Schütteln / RT)

Tab.7: Verstärker im Mn⁺⁺-POD-System

Eine sehr geringe Grund-Ethylenbildung aus KMB durch POD-Mn⁺⁺ wird durch das Phenol pHAP, wie durch Bisulfit sehr deutlich verstärkt. Beide Verstärker zusammen ergeben einen überadditiven Effekt.

Die minimale Grundrate war innerhalb eines Versuches bei Doppelproben geringen Schwankungen unterworfen. Verschiedene Versuchsansätze ergaben aber größere Streuungen, so daß stets sämtliche Grundansätze als Kontrollen in einem Ansatz enthalten waren.

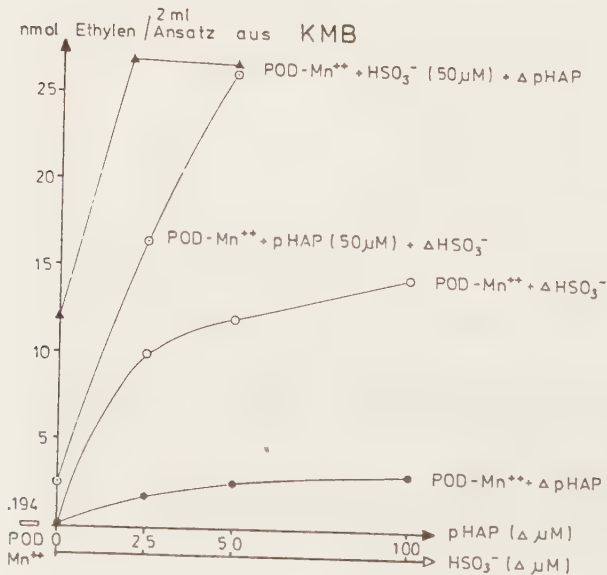
2.1.2.2. POD-Mn⁺⁺-System auf KMB = ACC



Ansatz (2 ml):

P-Puffer,	100 mM
pH=7,8	
POD	10 U
Mn ⁺⁺	50 μM
pHAP	25-50-100 μM
HSO ₃ ⁻	25-50-100 μM
KMB/ACC	2,5 mM

Abb.20/21: KMB- bzw. ACC-Spaltung durch POD-Mn⁺⁺ ± pHAP ± HSO₃⁻



pmol Ethylen / 2 ml
 Grundrate

POD-HSO₃⁻ (50 μM)

KMB 504

ACC 0

Peroxidase und Mn^{++} sind in der Lage sowohl KMB, als auch ACC zu fragmentieren.

Diese Grundrate wird gegenüber beiden Monitormolekülen durch pHAP und ebenso durch HSO_3^- sehr stark stimuliert.

Während gegenüber KMB die Sulfit-Stimulation deutlich stärker zum Tragen kommt, ist der Effekt durch pHAP bei ACC stärker (allerdings auf tiefem Niveau) ausgeprägt.

Interessant ist die Grundrate durch $POD-HSO_3^-$ im KMB-System, wogegen ACC ohne Mn^{++} keine Ethylenfreisetzung zeigt.

Der synergistische Effekt durch eine Kombination $pHAP-HSO_3^-$ ist bei KMB auffallender:

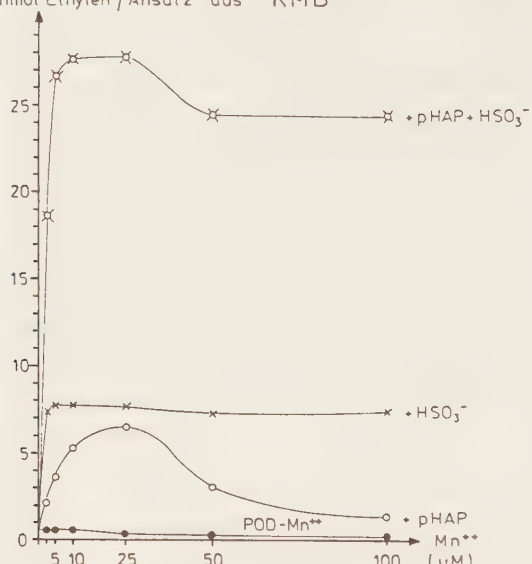
Bei konstanter HSO_3^- -Konzentration und variierter pHAP-Menge ist das System rasch gesättigt, während umgekehrt eine steigende HSO_3^- -Konzentration steigende Ethylenmengen zur Folge hat.

Die ACC-Spaltung ist dagegen in beiden Fällen rasch im Sättigungsbereich.

Die limitierte HSO_3^- -Konzentration kommt bei ACC in diesem Konzentrationsbereich nicht zum Tragen.

2.1.2.3. Einfluß der Mangan⁺⁺-Konzentration

nmol Ethylen / 2 ml Ansatz aus KMB



Ansatz (2 ml):

P-Puffer, 100 mM
pH = 7,8
POD 10 U
Mn⁺⁺ 2,5-100 μM
pHAP 50 μM
HSO₃⁻ 50 μM
KMB 2,5 mM
Rkt.zeit: 30 min.

Abb.22 : Mn⁺⁺-Einfluß im KMB-System

Die minimale Ethylenfreisetzung durch POD-Mn⁺⁺ hat bei 10 μM Mn⁺⁺ ihr "Optimum" gegenüber KMB.

Die pHAP-Stimulation erreicht bei 25 μM Mn⁺⁺ den höchsten Ethylenwert, nimmt danach deutlich ab. Die Reaktion POD-Mn⁺⁺ + HSO₃⁻ bleibt auf unverändert hohem Niveau, das bereits ab 2,5 μM erreicht ist.

Die synergistische Reaktion hat ihr Optimum zwischen 10 und 25 μM Mn⁺⁺; sie bleibt allerdings bei sehr hohen Werten.

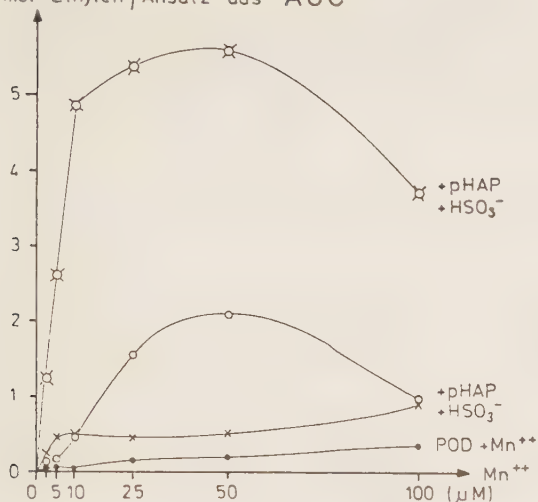
ACC wird durch das Grundsystem POD-Mn⁺⁺ mit steigender Mn⁺⁺-Konzentration stärker gespalten.

Die pHAP-Stimulation besitzt ein deutliches Maximum bei 50 μM; sie liegt über der HSO₃⁻-Stimulation, die nahezu auf konstanter Höhe bleibt.

Der synergistische Effekt durch HSO₃⁻ und pHAP verläuft ähnlich der pHAP-abhängigen Reaktion mit einem Optimum bei 50 μM Mangan.

Beim Vergleich der KMB- mit der ACC-Spaltung fällt trotz unterschiedlicher Mangan-Optima und unterschiedlicher Stärke des pHAP- und HSO₃⁻-Einflusses die ähnliche Tendenz bei der überadditiven Wirkung beider Verstärker auf: Überlagerung der HSO₃⁻ und pHAP-Kurve, aber erheblich über dem rein additiven Niveau.

nmol Ethylen / 2 ml Ansatz aus ACC



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 Mn⁺⁺ 2,5-100 μM
 pHAP 50 μM
 HSO₃⁻ 50 μM
 ACC 2,5 mM
 Rkt.zeit: 30 min.

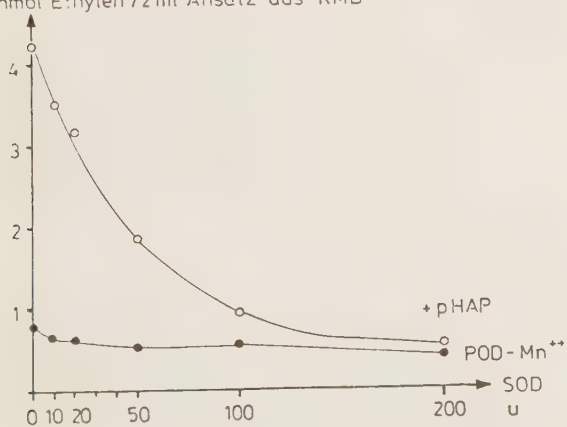
Abb. 23: Mangan⁺⁺-Konzentrationseinfluß

2.1.2.4. Einfluß der Hemmstoffe auf POD-Mangan⁺⁺

2.1.2.4.1. SOD-Einfluß

SOD-Abhängigkeit der Reaktion POD-Mn⁺⁺ ± pHAP

nmol Ethylen / 2 ml Ansatz aus KMB



Ansatz (2 ml):
 P-Puffer, pH = 7,8 100 mM
 Mn⁺⁺ 50 μM
 pHAP 50 μM
 SOD 10-200 U
 KMB 2,5 mM
 Rkt.zeit: 30 min.

Abb. 24: SOD-Hemmung der Reaktion POD/Mn⁺⁺/pHAP

Die KMB-Spaltung durch die Grundreaktion POD-Mangan wird von SOD nicht signifikant beeinflusst. Sehr deutlich ist die SOD-Hemmung der durch das Phenol pHAP verstärkten Reaktion. Die pHAP-Stimulation wird mit Erhöhung der SOD-Konzentration auf "Grundreaktionsniveau" gehemmt.

Faktor der pHAP-Stimulation

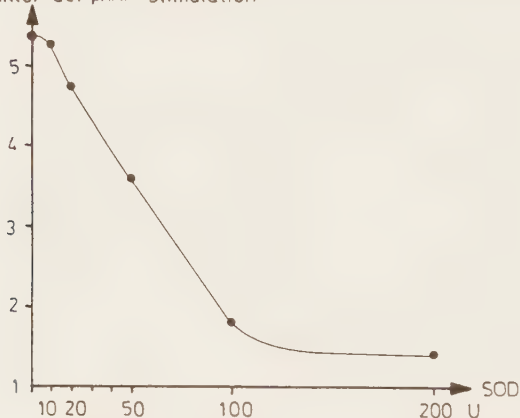
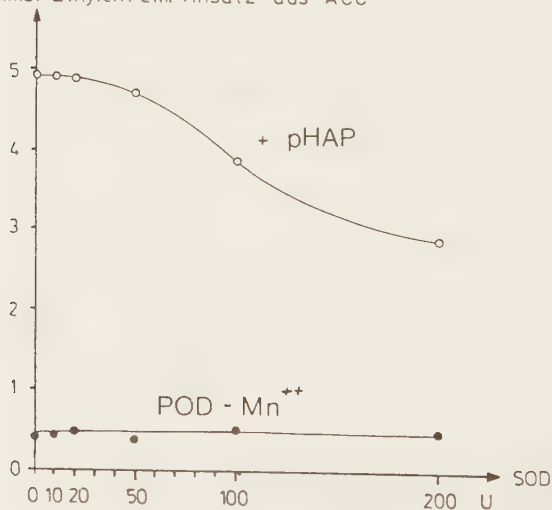


Abb. 25: SOD-Hemmung der pHAP-Stimulation

nmol Ethylen/2ml Ansatz aus ACC



Ansatz (2 ml):

P-Puffer, 100 mM
 pH = 7,8
 POD 10 U
 Mn⁺⁺ 50 μM
 pHAP 50 μM
 SOD 10-200 U
 ACC 2,5 mM
 Rkt.zeit: 30 min.

Abb. 26: SOD-Hemmung der ACC-Spaltung

Auch auf die ACC-Spaltung der pHAP-stimulierten Grundreaktion POD-Mn⁺⁺ wirkt sich die SOD-Hemmung aus. Die durch SOD unbeeinflussbare Grundreaktion wird durch pHAP um den Faktor 12,2 stimuliert; durch 200 U SOD wird der Effekt auf den Faktor 6 verringert. Die Hemmung durch SOD unterscheidet sich somit im gleichen System, allerdings mit verschiedenen Monitoren recht deutlich.

SOD-Einfluß auf die pHAP-HSO₃⁻-stimulierte POD-Mn⁺⁺-Reaktion

System	SOD	pmol Ethylen / 2ml Ansatz		Ansatz		Ansatz: Phosphatpuffer, pH = 7.8 100 mM
		KMB	% Hemmung	ACC	% Hemmung	
POD - Mn ⁺⁺	—	793	—	408	—	POD 100/2 ml Ansatz
" " 100 U	100 U	551	31	412	0	Mn ⁺⁺ 50 µM
POD - Mn ⁺⁺ - pHAP	—	4249	—	4908	—	pHAP 50 µM
" " " 100 U	100 U	944	78	3861	21	HSO ₃ ⁻ 50 µM
POD - Mn ⁺⁺ - HSO ₃ ⁻	—	2532	—	1605	—	KMB/ACC 2.5 mM
" " " 100 U	100 U	10428	17	1037	35	Reaktionszeit: 30 Minuten
POD-Mn ⁺⁺ -pHAP-HSO ₃ ⁻	—	26276	—	5140	—	
" " " " 100 U	100 U	23938	9	4019	22	

Tab.8: SOD-Hemmung in unterschiedlichen Mn⁺⁺-POD-Systemen

Geringen Einfluß zeigt SOD auf die Grundreaktion gegenüber KMB; die ACC-Spaltung bleibt unbeeinflusst. Sowohl die pHAP-, die HSO₃⁻-stimulierte, als auch die mit beiden Verstärkern beeinflusste Reaktion zeigt nur einen geringen SOD-Einfluß gegenüber ACC als Monitor.

Als einziges System wird POD-Mn⁺⁺-pHAP mit KMB deutlich SOD-beeinflusst.

Dagegen ist die HSO₃⁻-verstärkte, sowie die synergistisch erhöhte Reaktion im KMB-System ohne große SOD-Wirkung.

2.1.2.4.2. Katalase-Einfluß auf das System POD-Mn⁺⁺

In keinem der vier Systeme zeigt sich ein signifikanter Eingriff durch Katalase.

Da stets sämtliche Grundansätze bei jeder Untersuchung durchgeführt wurden, die eine nicht zu vernachlässigende Streuung aufwiesen, wurde die prozentuale Hemmung stets nur innerhalb eines Ansatzes verglichen.

Mittelwerte aus einer Reihe verschiedener Ansätze würden zu falschen Schlüssen führen.

System	KAT	p mol KMB	Ethylen / 2 % Hemmung	ml ACC	Ansatz % Hemmung	Ansatz: Phosphatpuffer, pH = 7.8	100 mM
POD - Mn ⁺⁺	—	820	—	411	—	POD	10U/2 ml
" " " " " "	100 U	704	14	634	0	Mn ⁺⁺	50 µM
POD - Mn ⁺⁺ + pHAP	—	3739	—	3520	—	pHAP	50 µM
" " " " " "	100 U	3086	18	3164	11	HSO ₃ ⁻	50 µM
POD - Mn ⁺⁺ + HSO ₃ ⁻	—	16794	—	2563	—	KMB/ACC	2.5 mM
" " " " " "	100 U	14613	13	2403	6		
POD - Mn ⁺⁺ + HSO ₃ ⁻ + pHAP	—	33292	—	8525	—		
" " " " " "	100 U	33383	0	8279	3		

Reaktionszeit: 30 Minuten

Tab.9: Katalaseeinfluß in den POD-Mn⁺⁺-Systemen

2.1.2.4.3. Einfluß durch Mannit

System	Mannit	p mol KMB	Ethylen / 2 % Hemmung	ml ACC	Ansatz % Hemmung	Ansatz: Phosphatpuffer, pH = 7.8	100 mM
POD - Mn ⁺⁺	—	473	—	169	—	POD	10U/2 ml
" " " " " "	2.5 mM	341	28	141	17	Mn ⁺⁺	50 µM
POD - Mn ⁺⁺ + pHAP	—	3685	—	3625	—	pHAP	50 µM
" " " " " "	2.5 mM	3068	17	3220	9	HSO ₃ ⁻	50 µM
POD - Mn ⁺⁺ + HSO ₃ ⁻	—	10438	—	1629	—	KMB/ACC	2.5 mM
" " " " " "	2.5 mM	8943	14	1376	16		
POD - Mn ⁺⁺ + pHAP + HSO ₃ ⁻	—	24520	—	9203	—		
" " " " " "	2.5 mM	23697	3	9240	0		

Reaktionszeit: 30 Minuten

Tab.10: Manniteinfluß in POD-Mn⁺⁺-Systemen

In keinem der Systeme ist auch bei hohen Mannit-Konzentration ein deutlicher Hemm-Effekt festzustellen.

2.1.3. Gegenüberstellung der Systeme POD - H₂O₂ und POD-Mangan⁺⁺

Im folgenden wurde die Reaktivität der beiden Systeme

- bei drei verschiedenen pH-Werten (6,0 - 7,8 - 8,5)
- gegenüber den beiden Monitormolekülen ACC und KMB,
- unter dem Einfluß von pHAP und HSO₃⁻ untersucht.

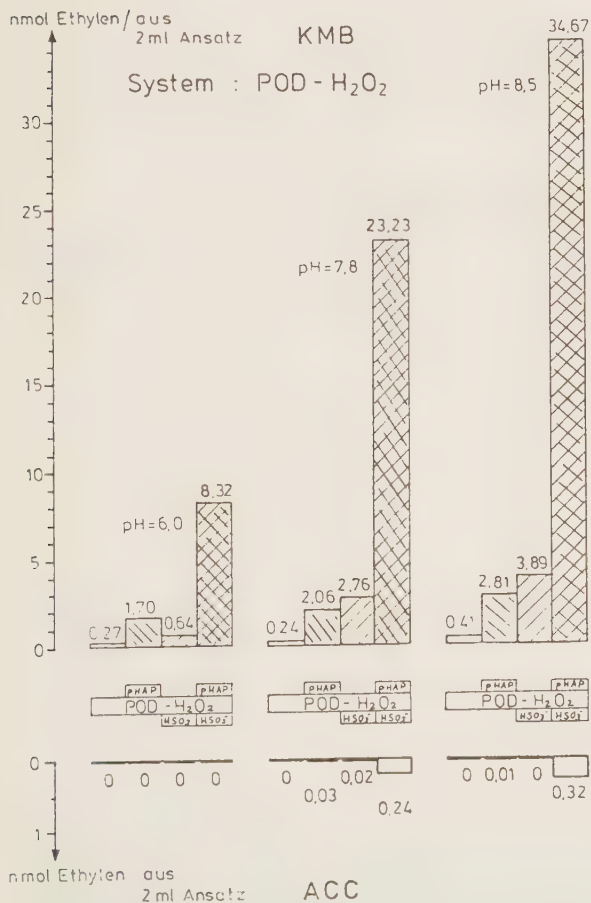
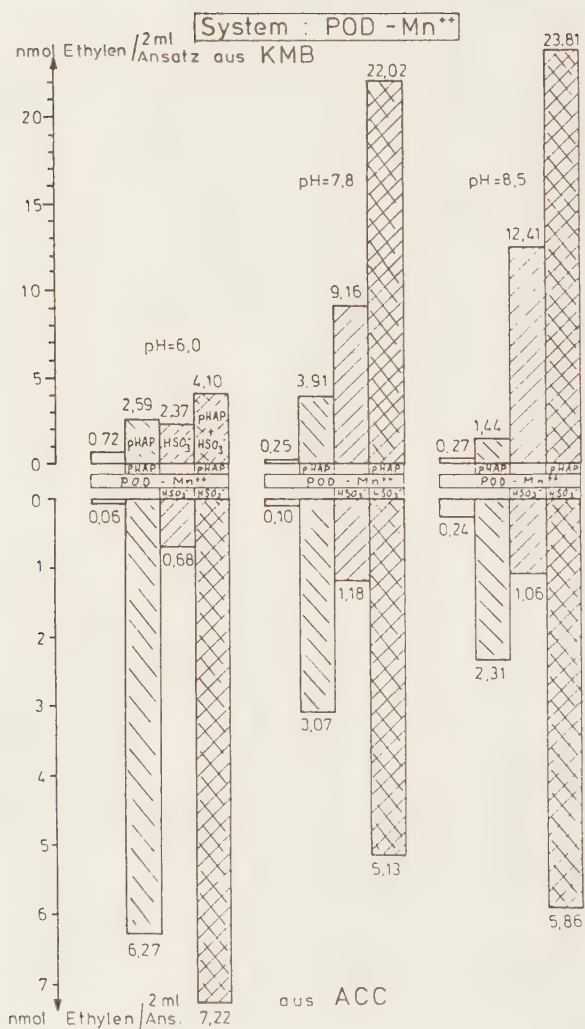


Abb. 27: POD-H₂O₂-System gegenüber KMB und ACC



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH=6,0/7,8/8,5 100 mM
 POD 10 U
 Mn⁺⁺ 50 µM
 pHAP 50 µM
 HSO₃⁻ 50 µM
 KMB/ ACC 2,5 mM
 Reaktionszeit: 30 min.

Abb.28: POD-Mn⁺⁺-Systeme gegenüber KMB und ACC

Am deutlichsten fällt wohl die mangelnde Reaktivität des H₂O₂-System gegenüber der ACC-Spaltung auf. Die minimale Ethylenmenge durch POD-H₂O₂ ist im Alkalischen etwas höher; ebenso nimmt die Stimulation durch pHAP wie durch HSO₃⁻ zum pH- Wert 8,5 zu.

Die Absolutwerte des Synergismus durch pHAP und HSO_3^- nehmen zum Alkalischen rapide zu; der Faktor, um den der tatsächliche Wert über dem rein additiven liegt steigt von 3,6 über 4,8 auf 5.2 an.

Das System POD-Mn²⁺ spaltet sowohl KMB als auch ACC, wobei mit ACC die Absolutwerte tiefer liegen.

Gegenüber KMB sinkt die minimale Reaktivität des Grundsystems gegen pH = 8,5. Die Stimulation durch pHAP ist im Alkalischen ebenso geringer; HSO_3^- wirkt dagegen bei pH = 8,5 wesentlich stärker. Der Synergismus nimmt zum Alkalischen ebenfalls zu, wobei er allerdings nie die Werte des H_2O_2 -Systems erreicht. Die höhere Reaktivität zeigt das System gegenüber ACC dagegen im sauren Bereich.

Die pHAP-Stimulation kommt bei pH = 6,0 am deutlichsten zum Tragen; ebenso sind die Werte durch pHAP + HSO_3^- hier am höchsten.

Die synergistischen Effekte sind entsprechend der KMB-Spaltung bei 8,5 am deutlichsten, dabei aber nicht ganz so hoch.

2.1.4. System: Peroxidase - Mangan -NADH

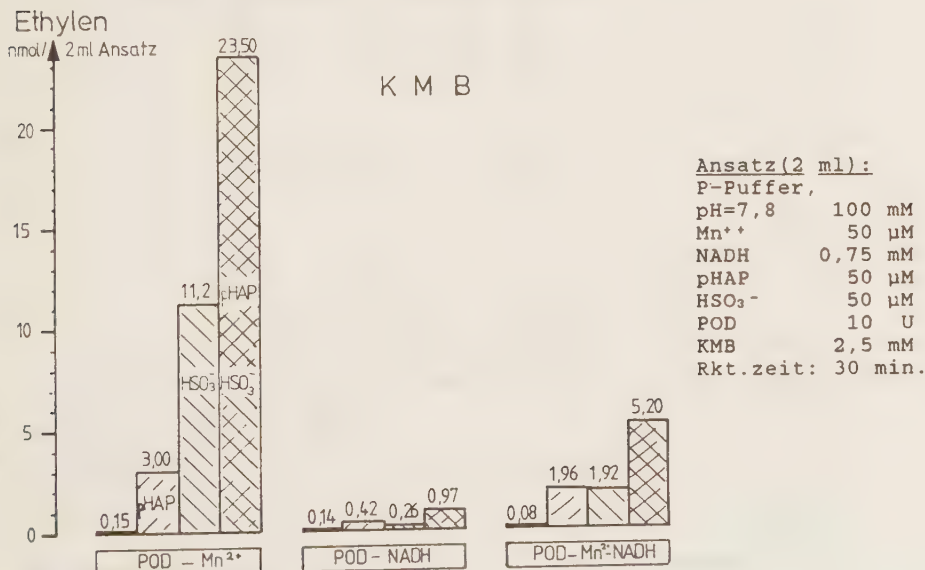


Abb.29: NADH im Mn²⁺-POD-System

Das für einige Peroxidase-Reaktionen in vivo erforderliche NADH zeigt mit POD nur geringe KMB-Spaltung.

pHAP stimuliert die Grundreaktion; HSO_3^- in geringerem Maße. Die synergistische Wirkung durch pHAP und HSO_3^- liegt um 42%

über dem rein additiven Wert. Interessant ist bei Kombination von Mn^{++} und NADH mit Peroxidase die auffallende Erniedrigung der sehr hohen Werte bei $POD-Mn^{++}$. Die Stimulation durch HSO_3^- ist nach Absenkung durch NADH gleich der durch pHAP; bei Mn^{++} ist sie erheblich größer. Auch die ACC-Spaltung wird negativ durch NADH-Zugabe beeinflusst: 63 %-Hemmung bei dem synergistischen Wert.

2.1.5. Vergleich der Peroxidase-Systeme H_2O_2 - GSH - CYS - HSO_3^-

2.1.5.1. KMB - ACC - MET-Spaltung System : Peroxidase +

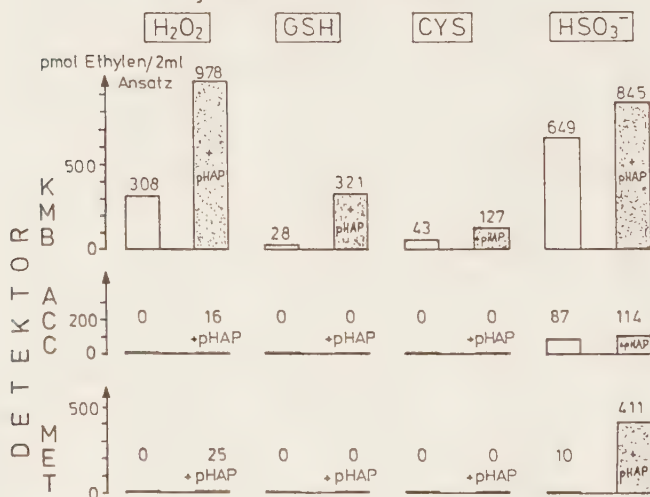


Abb.30: POD-Systeme gegenüber KMB/ ACC/ MET

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer, pH=7,8 100 mM POD 10 U
 H_2O_2 0,5 mM GSH 0,5 mM
 CYS 0,5 mM HSO_3^- 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM KMB/ACC/MET 2,5 mM
 Reaktionszeit: 30 min.

α -Ketomethiolbuttersäure wird von allen vier Systemen fragmentiert.

H_2O_2 und HSO_3^- spalten KMB meßbar, GSH erheblich weniger und CYS in noch geringerem Ausmaß.

Die beiden anderen Detektor-Moleküle ACC und Methionin werden von den Systemen H_2O_2 -, GSH- und CYS-POD weder mit noch ohne Phenol angegriffen.

Einzig das Peroxidase-Bisulfit-System zeigt die Fähigkeit, ACC (in sehr geringem Maße), wie auch MET, zu spalten.

In allen Fällen wird die Reaktivität der Systeme durch pHAP stimuliert; im Fall der Methionin-Spaltung durch POD-HSO₃⁻ überhaupt erst ermöglicht.

Die unterhalb einer sinnvollen Meßgrenze liegenden Werte der ACC-, bzw. MET-Spaltung durch H₂O₂-POD + pHAP lassen sich durch Konzentrationserhöhung von H₂O₂ um den Faktor 5 auf Werte um 100 p mol Ethylen steigern (lineare Beziehung), pHAP muß dabei anwesend sein.

Die pHAP-Konzentration befindet sich dabei bereits im Bereich der Sättigung.

Die Parallelwerte zeigen innerhalb eines Ansatzes geringe Streuung. Jeder Ansatz enthält deshalb die nötigen Kontrollen.

2.1.5.2. Einfluß der Hemmstoffe: SOD - KAT - Asc

2.1.5.2.1. Superoxid-Dismutase

Einfluß auf die POD-Systeme im Vergleich

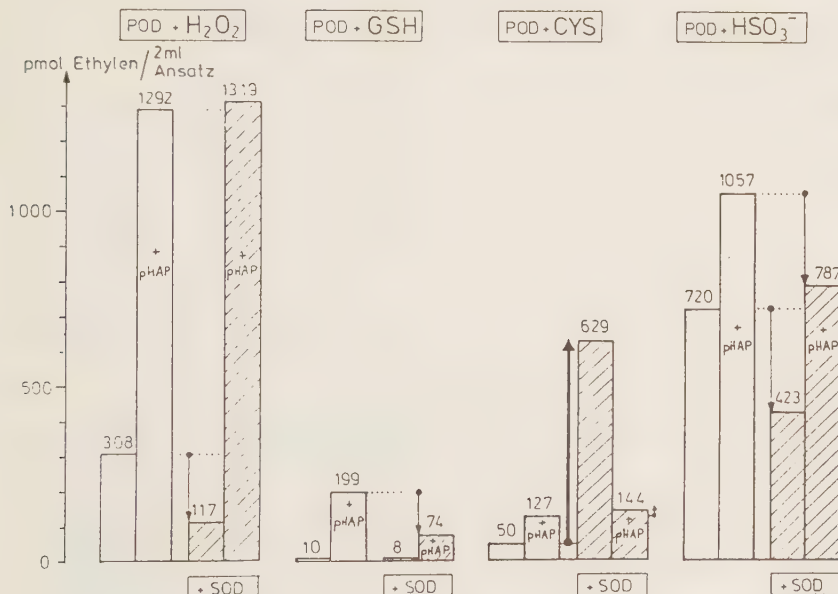


Abb.31: Hemmstoff-Einfluß gegenüber KMB-Spaltung durch POD-Systeme

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer, pH=7,8 100 mM POD 10 U
H₂O₂ / GSH / CYS / HSO₃⁻ 0,5 mM KMB 2,5 mM
SOD 100 U
Reaktionszeit: 30 min.

Der SOD-Einfluß auf die Reaaktion POD-H₂O₂ verursacht eine Hemmung um 62 %.

SOD zeigt dagegen auf die durch pHAP vervierfachte Ethylenbildung keine Wirkung.

Die minimale Reaktivität von POD-GSH läßt keine Aussage zu; GSH - pHAP - POD wird um 63 % gehemmt.

Die KMB-Spaltung durch POD - HSO₃⁻ wird durch SOD um 41 %, die durch pHAP erhöhte Aktivität um 25 % gehemmt.

Sehr charakteristisch ist die SOD-Wirkung auf die Peroxidase-Cystein-Reaktion:

Die Grundreaktion wird durch 100 U SOD um den Faktor 12,5 gesteigert!

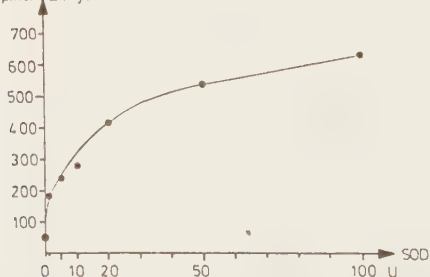
Die SOD-Wirkung auf die pHAP-stimulierte Reaktion ist geringfügiger (13 %).

Zunächst soll der SOD-Konzentrationseinfluß auf die POD-Cys-Reaktion untersucht werden:

Einfluß der SOD-Konzentration im System POD-CYSTEIN auf die KMB-Spaltung

System	p mol Ethylen/2 ml Ansatz	
POD - CYS	50	Faktor
POD - CYS + 1 U SOD	182	3,6
+ 5 U	240	4,8
+ 10 U	278	5,6
+ 20 U	419	8,4
+ 50 U	537	10,7
+ 100 U	629	12,6

pmol Ethylen/2 ml Ansatz

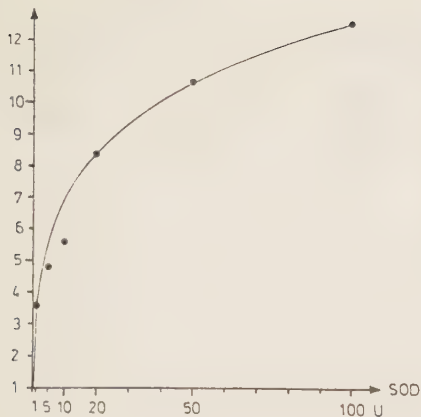


Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH=7,8 100 mM
 POD 10 U
 Cystein 0,5 mM
 SOD 1-100 U
 KMB 2,5 mM
 Rkt.zeit: 30 min.

Tab.11: SOD-Wirkung im POD-Cystein-System

Faktor der Stimulation



Die signifikante SOD-Stimulation der KMB-Spaltung durch POD - CYS ist Konzentrationsabhängig.

Bereits 1 U SOD vervierfacht den Grund-Ethylen-Wert. Der SOD-Einfluß auf die pHAP-veränderte Grundreaktion ist minimal.

Abb. 32: SOD-Stimulation im System POD - CYS

2.1.5.2.2. Hemmstoffe: Katalase-Ascorbat

Grundreaktion		KAT	ASC	pHAP - Stimulation		
					KAT	ASC
POD - H_2O_2	308	---	1769	1292	---	1138
POD - GSH	28	26	95	199	2-5	98
POD - CYS	50	5	299	127	74	181
POD - HSO_3^-	720	762	167	1057	929	165

2ml Ansatz:

Phosphatpuffer, 7.8 100 mM
 POD 10 U
 GSH/ CYS/ HSO_3^- 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 KMB 2,5 mM

Tab.12: KAT- und ASC-Einfluß der KMB-Spaltung durch POD-Systeme

Der Katalase-Einfluß wird nur bei Cystein deutlich: Sowohl Grundreaktion als auch die pHAP-stimulierte Reaktion werden gehemmt. Allerdings liegen die Ethylen-Werte im kritischen unteren Erfassungsbereich.

Glutathion und Bisulfit werden weder in der Grund-, noch in der stimulierten Reaktion beeinflußt.

Ascorbinsäure stimuliert sehr deutlich (5,7-fach) POD- H_2O_2 ; auf POD- H_2O_2 + pHAP zeigt sich kein Einfluß.

Sowohl pHAP-erhöhte als auch Grundreaktion POD- HSO_3^- werden dagegen gehemmt (auf 16 % bzw. 23 %).

POD-CYS wird sehr stark stimuliert, die Reaktion POD-CYS + pHAP leicht verstärkt.

Die Grundreaktion POD-GSH wird erhöht, die Reaktion POD-GSH + pHAP dagegen erniedrigt.

2.1.5.3. Einfluß des Carotinoids Crocin

	p mol Ethylen/2 ml Ansatz - pHAP	+ pHAP
POD - H ₂ O ₂ - CROCIN	460	1381
POD - GSH - CROCIN	75	246
POD - CYS - CROCIN	22	136
POD - HSO ₃ ⁻ - CROCIN	880	1093

Tab.13: Crocin-Einfluß auf POD-Systeme

Der Abbau des Carotinoid Crocin wurde durch diese Systeme ebenfalls untersucht. Es zeigten sich keine drastische Auswirkung auf die KMB-Spaltung durch obige peroxidative Systeme. Allenfalls ist eine leichte Anhebung der Ethylenbildung festzustellen.

2.2. Sauerstoff-Elektrode

Die Einflußnahme auf den Sauerstoffbilanz der unter 1. untersuchten Peroxidase-Systeme wurde beobachtet:

2.2.1. Peroxidase - H₂O₂

System	n mol O ₂ / 2 ml/min.
H ₂ O ₂	9 Freisetzung
+ POD	14 "
+ pHAP	10 "
+ Crocin	5 "
+ Ascorbat	28 Verbrauch

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH=7,8	100 mM	H ₂ O	ad 2 ml
POD	10 U	H ₂ O ₂	0,5 mM
pHAP	50 µM	Crocin	0,6 µM
Asc	0,5 mM	Rkt.zeit:	30 min.

Tab.14: O₂-Verbrauch/-Freisetzung durch POD-H₂O₂-Systeme

Der spontane Zerfall von H₂O₂ führt in geringem Maße zur Freisetzung von Sauerstoff; durch die Katalase-Aktivität der Peroxidase wird die Zersetzung verstärkt.

Die Reaktion des POD/H₂O₂-Systems mit dem Phenol vermindert die Freigesetzung von Sauerstoff durch H₂O₂-Verbrauch, noch-

malige Absenkung erfolgt nach Crocin-Zugabe.
Nach der Zugabe von Ascorbat nimmt das System deutlich Sauerstoff auf.

2.2.2. Peroxidase - Glutation

System	Sauerstoffverbrauch n mol/min, 2 ml
GSH	0
GSH + POD	2
↓ ↓ + Mn ²⁺	3
↓ ↓ + Crocin	2
GSH + POD + pHAP	24
↓ ↓ ↓ + Mn ²⁺	25
↓ ↓ ↓ + Crocin	24
↓ ↓ ↓ + Katalase	13
↓ ↓ ↓ + Ascorbat	0

Tab.15: Sauerstoffverbrauch im GSH-System

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer,

pH = 7,8	100 mM	Peroxidase	10 U
GSH	0,5 mM	Mn ²⁺	0,5 mM
pHAP	50 µM	Crocin	0,6 µM
Ascorbat	0,5 mM	KAT	100 U
Reaktionszeit:		30 min.	

Der peroxidative GSH-Abbau zeigt nur minimale Sauerstoffzehrung.

Keinen Einfluß auf diese Grundsauerstoffzehrung zeigt Mangan²⁺, ebenso wenig das lösliche Carotinoid Crocin. Deutlicher O₂-Verbrauch erfolgt nach Zugabe des Phenols pHAP. Die pHAP-Konzentration dürfte gesättigt sein, da eine Verdopplung nur auf 28 n mol O₂/2 ml/min erhöht.

Eine Erhöhung der GSH-Konzentration führt zu keiner Steigerung der Sauerstoffaufnahme.

Hitzeinaktivierte POD zeigt keine O₂-Zehrung (Cystein - POD wird ausführlich unter B II abgeklärt).

Katalase reduziert den Sauerstoffverbrauch auf ca. 54 %, was die Entstehung von H₂O₂ nahelegt.

Das Reduktionsmittel Natriumascorbat verhindert eine Reduktion des Sauerstoffs vollständig.

2.2.3. POD - Mangan²⁺

System	Sauerstoffverbrauch n mol O ₂ /min., 2 ml
Peroxidase - Mangan ²⁺	0
Peroxidase - Mangan ²⁺ + pHAP	0

Peroxidase (10 U) und Mangan²⁺-Ionen (0,5 mM) sind nicht in der Lage, alleine Sauerstoff zu reduzieren; auch die Zugabe von pHAP (0,5 mM) führt zu keinem Sauerstoffverbrauch. Die Kenntnis über die Fähigkeit der KMB- bzw. ACC-Spaltung durch POD/Mn²⁺ fordert die Untersuchung, ob KMB- bzw. ACC als Elektronen-Donor fungieren können:

System	n mol O ₂ /min/2 ml
POD - Mn ²⁺ + — KMB	0
POD - Mn ²⁺ + pHAP + KMB	0
POD - Mn ²⁺ + — ACC	0
POD - Mn ²⁺ + pHAP + ACC	42

Tab.16/17: Sauerstoffverbrauch im Mangan-System

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer,

pH = 7,8	100 mM	POD	10 U
Mn ²⁺	50 µM	pHAP	0,5 mM
KMB, ACC	2,5 mM	Rkt.zeit:	30 min.
Temperatur = 22° C - 533 n mol O ₂ /2 ml/min.			

KMB ist nicht in der Lage, sowohl mit als auch ohne Phenol im POD/Mn²⁺-System Sauerstoff zu reduzieren. ACC ist dagegen mit pHAP und POD/Mn²⁺ befähigt, Sauerstoff zu verbrauchen; ohne das Phenol findet allerdings keine Reduktion statt.

2.2.4. Peroxidase - NADH

System	Sauerstoffverbrauch n mol O ₂ /2 ml/min
POD - NADH	1
POD - NADH + pHAP	7
↓ ↓ ↓ + KAT	3,3

Tab.18: Sauerstoffverbrauch im NADH-System

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer,

pH = 7,8	100 mM	POD	10 U
NADH	0,5 mM	pHAP	50 µM
KAT	100 U	Rkt.zeit:	30 min.

Temperatur = 20° C : 552 n mol O₂ / 2 ml

Die Sauerstoffaufnahme durch das Grundsystem Peroxidase/NADH ist vernachlässigbar gering.

Erst durch Zugabe des Phenols setzt eine deutlich meßbare O₂-Reduktion ein.

100 U Katalase bewirken eine Halbierung der Rate des Sauerstoffverbrauchs, was eine H₂O₂-Entstehung erklären könnte.

2.2.5. Bisulfit-Peroxidase-System

System	Sauerstoffverbrauch n mol O ₂ / 2 ml/min.
HSO ₃ ⁻	6
HSO ₃ ⁻ + pHAP	20
HSO ₃ ⁻ --- + KAT	3
HSO ₃ ⁻ + pHAP + KAT	9
HSO ₃ ⁻ + POD	201
HSO ₃ ⁻ + POD + pHAP	363
HSO ₃ ⁻ + Crocin	0
HSO ₃ ⁻ + Crocin + POD	54
HSO ₃ ⁻ + Crocin + POD + pHAP	108
HSO ₃ ⁻ + POD + pHAP + Ascorbat	0

Tab.19: Sauerstoffverbrauch im Sulfit-System

Ansatz/2 ml: Phosphatpuffer,

pH = 7,8	100 mM	H ₂ O	ad	2 ml
POD	10 U	pHAP		50 µM
HSO ₃ ⁻	0,5 mM	Crocin		0,7 µM
KAT	10 U	Ascorbat		0,5 mM

Temperatur = 21° C - 542 n mol O₂ / 2 ml/min.

Bereits ohne Enzym nimmt Bisulfit Sauerstoff auf; verstärkt durch pHAP erhöht sich dieser Grundwert. Katalase verlangsamt diese Sauerstoffreduktion auf ca. 50 %, sowohl bei HSO₃⁻, als auch bei HSO₃⁻ + pHAP.

Durch Peroxidase erhöht sich diese O_2 -Zehrung extrem, wiederum verstärkt durch pHAP. Die sehr heftige Reaktion macht eine Katalase-Beeinflussung undeutlich. Die Zugabe der mehrfach ungesättigten Verbindung Crocin verlangsamt die Sauerstoffaufnahme; die Grundrate verschwindet ganz. Die Gesamtreaktion $POD + pHAP + HSO_3^-$ kommt durch Ascorbat völlig zum Erliegen.

2.3. Crocin-Bleichung

2.3.1. System: Peroxidase - H_2O_2

Einfluß der H_2O_2 -Konzentration

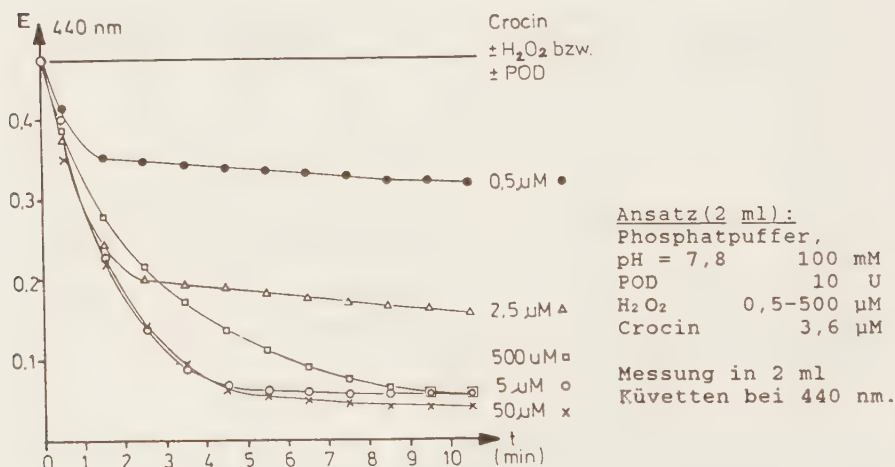


Abb.33: H_2O_2 -Einfluß auf Crocin-Bleichung durch $POD-H_2O_2$

Das wasserlösliche Carotinoid ist über einen langen Zeitraum (1d) bei Dunkelheit und obigen Bedingungen stabil.

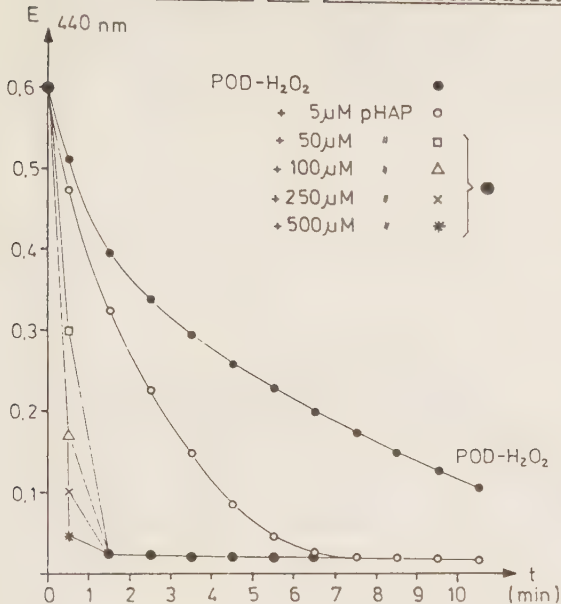
Weder H_2O_2 noch Peroxidase verursachen allein eine Abnahme der Extinktion bei 440 nm.

Durch das System $POD-H_2O_2$ wird Crocin im Dunkeln oxidativ abgebaut.

Die H_2O_2 -Konzentration hat über den weiten Bereich 5-500 μM nahezu den gleichen Einfluß: Abbau(>90%) innerhalb von 10 Minuten.

Erst unterhalb 5 μM verläuft die Bleichungsreaktion, nach anfänglich geringer Abnahme, erheblich langsamer.

2.3.1.2. Einfluß der pHAP-Konzentration



Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 H₂O₂ 0,5 mM
 Crocin 4,5 µM
 pHAP 5-500 µM

Abb. 34: pHAP-Einfluß auf die Crocin-Bleichung durch POD-H₂O₂

Die Grundbleichungsrate des Crocins durch das System Peroxidase-H₂O₂ wird bereits durch geringste pHAP-Konzentrationen erheblich beschleunigt.

Ab der Konzentration 50 µM ist zum Zeitpunkt 1,5 Min. bereits das gesamte Crocin abgebaut.

Eine pHAP-Konzentrationsabhängigkeit ist nur bei dem 30 sek.-Meßpunkt auszumachen.

Als H₂O₂-Konzentration wurde 500 µM gewählt, da die Reaktion bei 250 µM bzw. 50 µM noch rascher abläuft; die grundsätzliche pHAP-Stimulation ist aber entsprechend.

Bei 5 µM H₂O₂ ist nur eine geringe pHAP-Stimulation, zunehmend von 5 auf 50 µM, dann wieder zurückgehend festzustellen.

Bei 0,5 µM H₂O₂ wird kein pHAP-Effekt sichtbar.

Beeinflussung der Crocin-Bleichung durch Picein

Es wurde im Bleichungssystem Peroxidase - H₂O₂ ein Vergleich der Stimulationseigenschaften von p-Hydroxyacetophenon und seinem Glucosid, Picein, angestellt:

Während pHAP (○), wie bereits gezeigt, drastisch die Crocin-Bleichung beschleunigt, hat Picein (x) keinerlei Einfluß auf die Reaktion.

Deutlich verändert ist die Situation, nachdem Picein 25 Minuten (bei 37° C) mit Cellulase vorinkubiert worden war (): die Verstärkung des Crocin-Abbaus ist der durch pHAP identisch. Durch die Spaltung der -glucosidischen Bindung und Freisetzung des Aglycons pHAP wird die Verstärkerwirkung aktiviert.

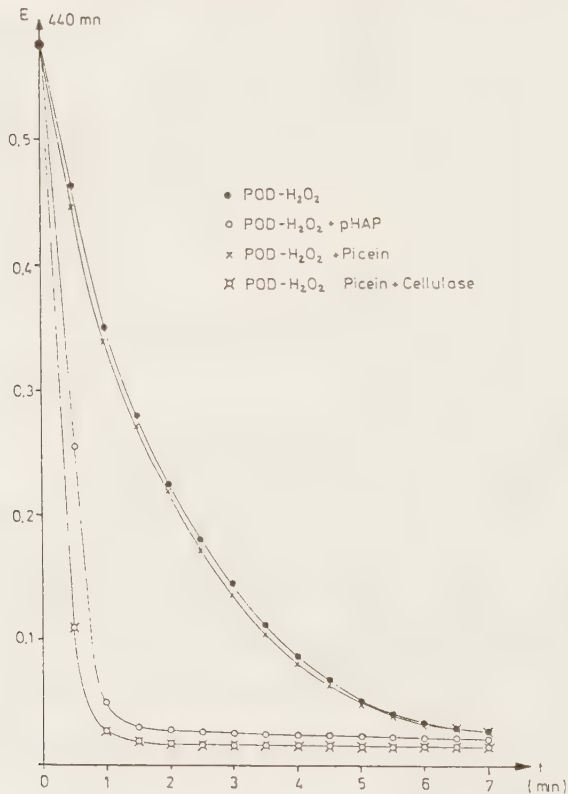


Abb.35: Picein-Einfluß im System POD-H₂O₂ auf Crocin-Bleichung

Vorinkubation: Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
H₂O ad 2 ml
Cellulase 1,5 U
Picein 500 µM
Temperatur = 37° C/25 Minuten

100 µl in den Bleichungsansatz

<u>Bleichungsansatz/2 ml:</u>	Phosphatpuffer, pH = 7,8	100 mM
	POD	10 U
	H ₂ O ₂	50 µM
	pHAP	25 µM
	Picein	25 µM
	Crocin	4,3 µM

2.3.1.3. Einfluß von Bisulfit auf die Crocinbleichung

<u>Ansatz/2 ml:</u>	Phosphatpuffer, pH = 7,8	100 mM
	POD	10 U
	H ₂ O ₂	50 µM
	HSO ₃ ⁻	50 µM
	Crocin	5 µM

In obigem Reaktionsansatz wird Crocin durch POD-H₂O₂ innerhalb 10 Minuten vollständig gebleicht. Durch die Zugabe von HSO₃⁻ wird die Reaktion extrem beschleunigt: nach 30 Sekunden ist bereits ein totaler Abbau erfolgt. Das zweite Substrat, Sulfit, dessen Reaktion gesondert später betrachtet wird, greift bei entsprechender Konzentration noch deutlicher als pHAP verstärkend in die Bleichung ein.

2.3.1.4. Einfluß der Hemmstoffe: SOD und Ascorbat

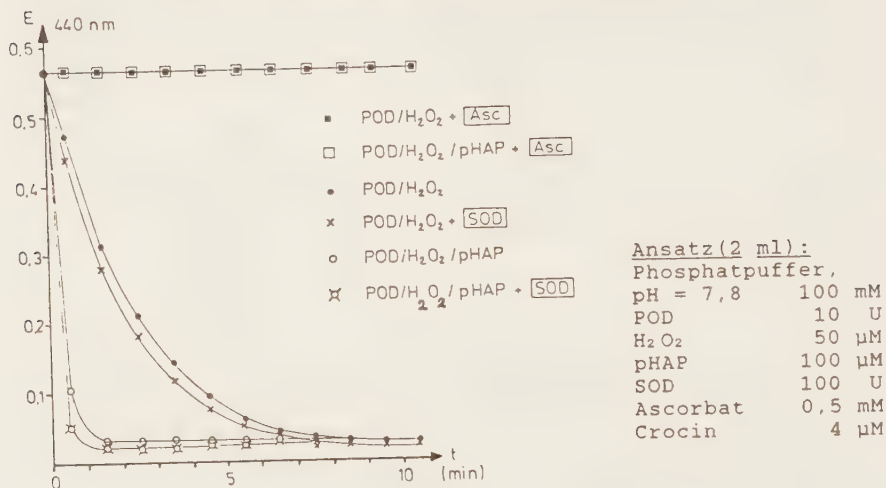


Abb.36: Crocin-Bleichung - Hemmstoffe im System POD-H₂O₂

Die schnelle Bleichung des Crocins durch POD/H₂O₂ bleibt durch Superoxid-Dismutase unbeeinflusst.

Die erheblich durch das Phenol p-Hydroxyacetophenon beschleunigte Reaktion zeigt ebenfalls keinen SOD-Effekt.

Vollständige Hemmung des Crocin-Abbaus durch Natriumascorbat erfolgt sowohl in der Grundreaktion als auch in der pHAP-verstärkten Reaktion.

Auf die Untersuchung eines Katalase-Einflusses wurde verzichtet.

5 μM Crocin-Lösung besitzt bei 322 nm eine Grundabsorption von 0,282, bei 265 nm eine von 0,467, welche für die pHAP- bzw. Asc-Bestimmung abgezogen wurde.

Crocin wird durch die Grundreaktion (●—●) POD/H₂O₂ innerhalb 10 Minuten gebleicht; durch pHAP-Verstärkung ist die Reaktion bereits nach 1 Minute beendet (○—○).

Während der pHAP-verstärkten Reaktion wird gleichzeitig pHAP abgebaut (○***○). (Messung des 2. Maximums, das im Alkalischen zunimmt).

Ascorbat schützt während der POD/H₂O₂-Reaktion Crocin (▲—▲) bis auf eine geringfügige Abnahme fast völlig.

Ascorbinsäure wird dagegen vollständig abgebaut (▲--▲).

Durch pHAP-Zugabe wird Crocin nochmals geringfügig verbraucht, bleibt dann aber auf konstantem Niveau (▲—▲).

Während dieser Reaktion wird Ascorbat schneller als ohne pHAP oxidiert (▲-▲). Gleichzeitig schützt es das Phenol vor dem Abbau (▲***▲).

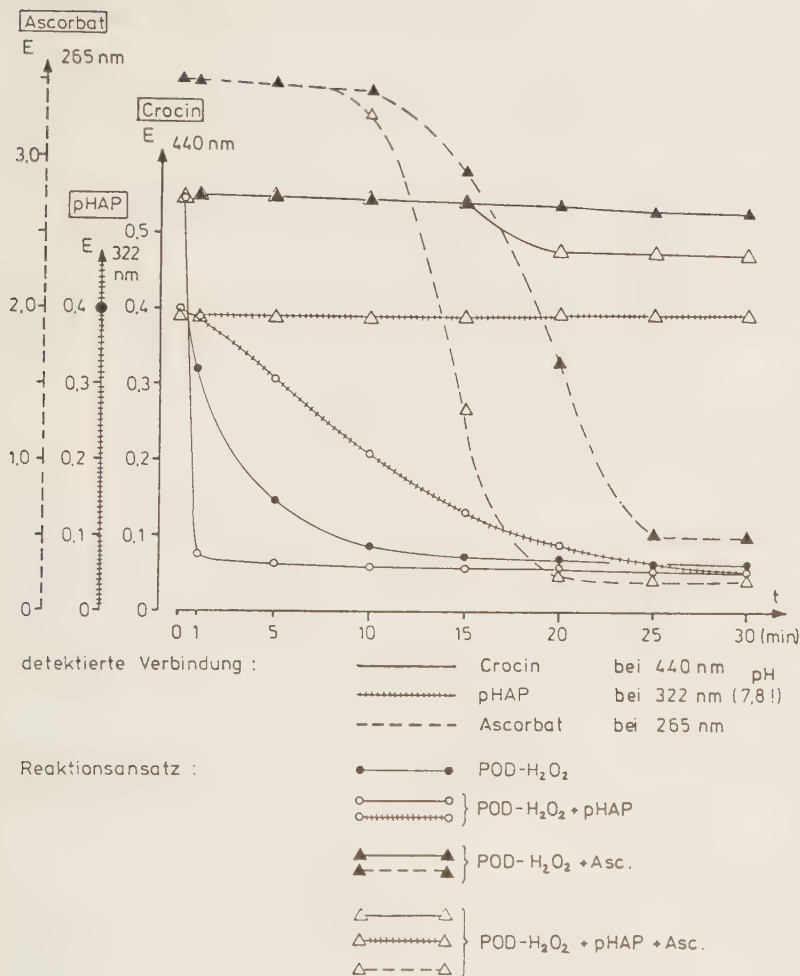


Abb.37: Kinetik des CROCIN - Abbaus durch POD/H₂O₂ bei gleichzeitiger Verfolgung von pHAP und Ascorbat

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM POD 10 U
H₂O₂ 0,5 mM pHAP 50 µM
Ascorbat 0,5 mM Crocin 5 µM
HSO₃⁻ 50 µM

Deutliche Verringerung des Ascorbat-Anteils (10 %) kann die Crocin-Bleichung nicht mehr verhindern, sondern nur zeitlich verzögern.

Ebenso beginnt bei geringen Ascorbat-Konzentrationen ein Abbau von pHAP, aber erst nach völligem Verschwinden von Ascorbat.

Ein Überschuß an Ascorbat verhindert dagegen jegliche noch so geringe Crocin-Bleichung.

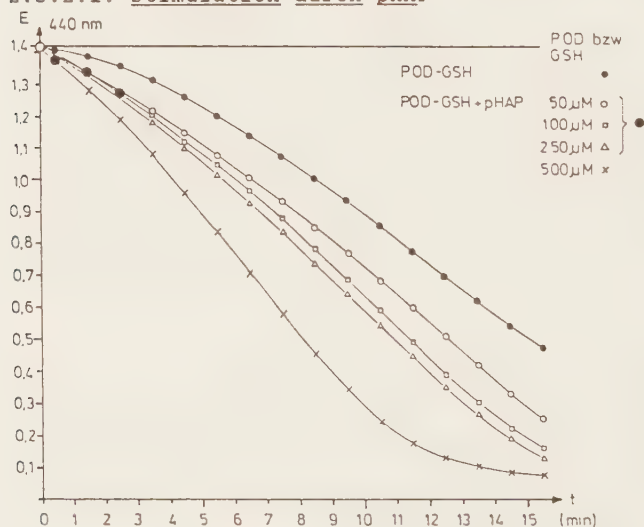
Bei dem HSO_3^- -verstärkten Reaktionsansatz bleibt die Crocin-Konzentration der Grundreaktion mit Ascorbat erhalten; die Ascorbinsäure dagegen wird deutlich langsamer abgebaut.

POD- H_2O_2 reagiert somit primär mit Bisulfit. Darauf folgt die Reaktivität gegenüber Ascorbat; das System zeigt die geringste Affinität zu p-Hydroxyacetophenon.

Anmerkung: Ascorbat nimmt bereits allein unter obigen Bedingungen um 23 % innerhalb 30 Minuten, mit POD um 14 % und mit H_2O_2 sogar um 38 % ab. POD- H_2O_2 baut Ascorbinsäure innerhalb dieser Zeit zu 95 % ab.

2.3.2. System: Peroxidase - Glutathion

2.3.2.1. Stimulation durch pHAP



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 GSH 0,5 mM
 pHAP 50-500 µM
 Crocin 10,6 mM
 Rkt.zeit: 30 min.

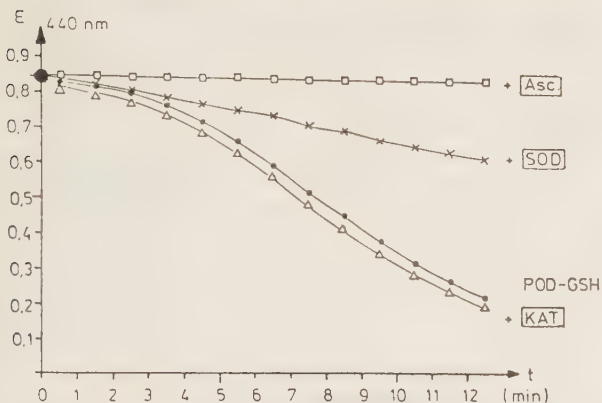
Abb.38: pHAP-Stimulation im System POD-GSH

Die durch den peroxidatischen GSH-Abbau vermittelte Crocin-Bleichung verläuft erheblich langsamer als bei entsprechender H_2O_2 -Konzentration.

p-Hydroxyacetophenon stimuliert konzentrationsabhängig den Abbau, allerdings in weitaus geringerem Maße als im POD- H_2O_2 -System.

Eine Absenkung der GSH-Konzentration führt zu einer Verlangsamung der Bleichung; der pHAP-Einfluß wird dabei noch geringer und ist unter 50 µM GSH nicht mehr meßbar.

2.3.2.2. Hemmstoff-Einfluß: KATALASE-SOD-Ascorbat



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 GSH 0,5 mM
 Ascorbat 0,5 mM
 SOD 100 U
 Crocin 6,3 µM
 KAT 100 U
 Rkt.zeit: 30 min.

Abb. 39: Hemmstoffeinfluß auf die Crocin-Bleichung durch POD-GSH

100 U Katalase zeigen keinen Effekt auf die Crocin-Bleichung durch POD-GSH.

Natriumascorbat hemmt ebenso wie bei POD-H₂O₂ die Abbaureaktion vollständig.

Im Gegensatz zur H₂O₂-Reaktion hat Superoxid-Dismutase eine deutliche Hemmwirkung. Der SOD-Kurvenverlauf ist im Gegensatz zur sigmoiden Grundreaktion linear.

Die pHAP-stimulierte POD-GSH-Bleichungsreaktion wurde nicht dargestellt: Ascorbat hemmt ebenfalls völlig - SOD hemmt deutlich (der Verlauf der Reaktion POD - GSH - pHAP - SOD liegt geringfügig unter (x) - Katalase ist ohne Einfluß auf den Crocin-Abbau.

Anmerkung: Bei geringerer Crocin-Konzentration erfolgt die Bleichung, wie zu erwarten ist, etwas schneller.

2.3.3. System: Peroxidase - Cystein

Einfluß der Hemmstoffe: Katalase - SOD - Ascorbat

Die durch Peroxidase und Cystein sehr langsam ablaufende Crocin-Bleichung wird durch p-Hydroxyacetophenon nur geringfügig beschleunigt.

Geringere Crocin-Konzentration bringt den Effekt etwas deutlicher heraus.

Ascorbinsäure hemmt auch diese Reaktion sowohl mit als auch ohne pHAP vollständig.

Ein geringfügiger Hemmeffekt durch Katalase macht sich bei der Grundreaktion, wie auch bei der pHAP-stimulierten Reaktion, bemerkbar.

Am auffallendsten dürfte in obiger Reaktion der stimulierende SOD-Effekt auf die POD-CYS-Bleichungsreaktion von Crocin sein.

Dieser SOD-Einfluß wird bei POD-CYS + pHAP noch deutlicher.

Ausführliche Betrachtungen der SOD-Wirkung unter B 2.5.

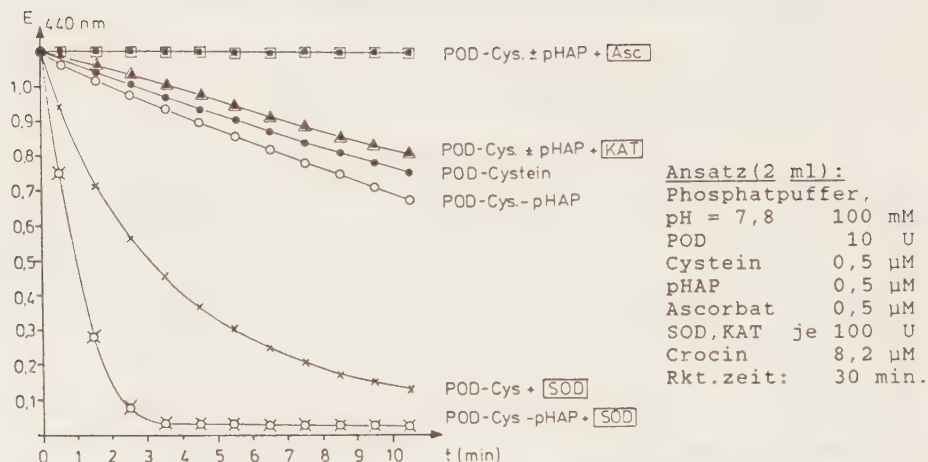


Abb.40: Hemmstoffwirkung auf die Crocin-Bleichung durch POD-CYS

2.3.4. Bleichungssystem: Peroxidase-Bisulfit

2.3.4.1. Stimulation durch pHAP

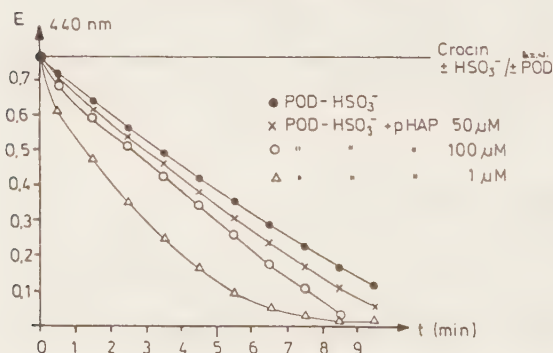


Abb.41: pHAP-Einfluß auf Crocin-Bleichung durch POD-HSO₃⁻

Das System Peroxidase und Bisulfit ist in der Lage, das Carotinoid Crocin abzubauen.

Die Bleichung wird mit Zugabe steigender Phenol-Konzentration zunehmend beschleunigt.

Die Einflußnahme durch p-Hydroxyacetophenon ist aber erheblich geringer als im System POD-H₂O₂ (oder GSH).

Da Bisulfit einer deutlichen Reaktion mit dem gelösten Sauerstoff im H_2O dest. unterliegt, wurde die entsprechende Bisulfit-Lösung stets neu vor jedem Reaktionsansatz hergestellt. Die unterschiedlich "alten" HSO_3^- -Lösungen zeigten erhebliche Reaktivitätsunterschiede. Die pHAP-Stimulation wurde durch Erhöhung der Crocin-Konzentration abgesenkt.

2.3.4.2. Einfluß der Hemmstoffe: KATALASE - SOD - Ascorbat

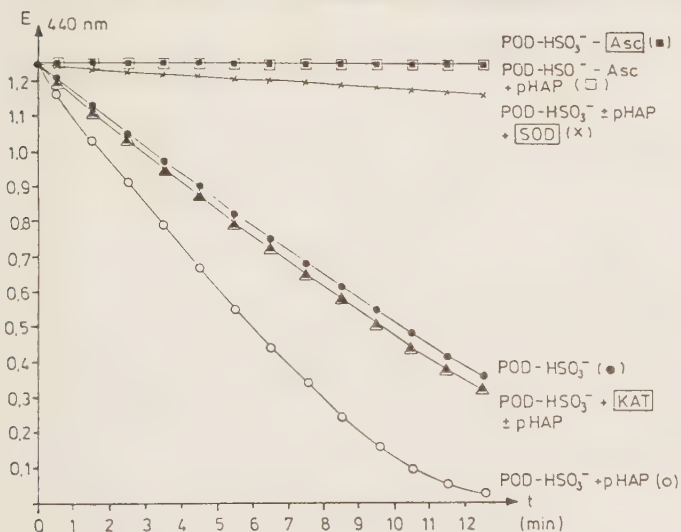


Abb.42: Hemmstoffwirkung auf Crocin-Bleichung durch $POD-HSO_3^-$

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer,

pH = 7,8	100 mM	POD	10 U
HSO_3^-	0,5 mM	pHAP	50 μ M
Ascorbat	0,5 mM	SOD	100 U
KAT	100 U	Crocin	9,4 μ M

Wie alle anderen Crocin-Abbaureaktionen durch POD, so wird auch mit HSO_3^- die Crocin-Bleichung durch Ascorbat völlig gehemmt und zwar sowohl die Grundreaktion, als auch die pHAP-stimulierte Reaktion.

Superoxid-Dismutase zeigt hier einen starken Hemm-Effekt, sowohl auf die Grundreaktion, als auch auf die verstärkte Reaktion.

Katalase beeinflusst die Grundreaktion nicht; auf $POD-HSO_3^-$ + pHAP wirkt sie um den gleichen Betrag bleichungshemmend, um den das Phenol die Grundreaktion stimuliert hat.

ÜBERSICHT

HEMMSTOFFWIRKUNG

Hemmstoff	Einfluß auf CROCINBLEICHUNG durch			
	POD - H_2O_2	POD - CYS	POD - GSH	POD - HSO_3^-
SOD	kein Einfluß	starke Stimulierung	starke Hemmung	fast völlige Hemmung
KATALASE	—	geringe Hemmung	kein Einfluß	kein Einfluß
ASCORBAT	völlige Hemmung			

2.3.5. Peroxidase-Mangan²⁺-System

2.3.5.1. Einfluß der Verstärker pHAP und Bisulfit

Das Peroxidase/ Mn^{2+} -System bewirkt sowohl KMB- als auch ACC-Fragmentation; es wurde auch im Crocin-Bleichungsansatz untersucht.

Crocin-Ausgangskonzentration: 4,4 μM

Messung nach 30 Minuten

Reaktionsansatz		
Crocin	—	4,4
↓	Mn^{2+}	4,4
	Mn^{2+} /POD	4,3
	Mn^{2+} /POD-pHAP	4,3
↓	Mn^{2+} /POD- HSO_3^-	0,2

Tab.20: POD-Mangan²⁺-Wirkung auf Crocin-Bleichung:
Effekt von pHAP und Sulfid

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 7,8	100 mM	POD	10 U
Mn^{2+}	50 μM	pHAP	50 μM
HSO_3^-	50 μM		

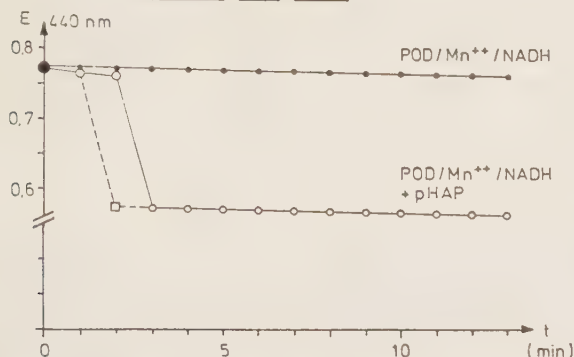
Innerhalb der Reaktionszeit von 30 Minuten nahm die eingesetzte Crocin-Konzentration nicht ab.

Das System POD/ Mn^{2+} war nicht in der Lage den Farbstoff abzubauen; auch die Zugabe des Verstärkers pHAP verursachte keine Bleichung.

Erst die Zugabe von Bisulfit bewirkt eine schnelle Bleichung: das Carotinoid war bereits nach 1 Minute abgebaut.

Anmerkung: POD-HSO_3^- (ohne Mn^{++}) verursacht schon Crocin-Bleichung, wobei allerdings Mangan $^{++}$ -Zugabe deutlich beschleunigt. Ebenso wird GSH-POD-Bleichung durch Mn^{++} verstärkt.

2.3.5.2. Einfluß von NADH



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 Mn^{++} 0,5 mM
 NADH 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 Crocin 5,6 μM

Abb.43: Crocin-Bleichung durch POD - NADH $\pm$ pHAP

Ebenso wie die Systeme Mn^{++} /Crocin und POD/Mn^{++} /Crocin keinen Einfluß auf die Bleichung zeigen, so bleibt das System auch nach NADH-Zugabe wirkungslos.

Erst der Verstärker pHAP bewirkt eine sprunghafte Abnahme ca. 2 Minuten nach der Phenolzugabe. Diese um 25 % reduzierte Crocin-Konzentration bleibt anschließend konstant.

Auch eine weitere Zugabe von pHAP (wie auch von allen vier Komponenten) bleibt ohne Einfluß.

Eine Verdopplung der pHAP-Konzentration (o) führt zu einem früheren "Sprung"!

Durch Ascorbat und Katalase läßt sich der Sprung verhindern; durch SOD dagegen ändert sich der "Bleichungsverlauf" durch POD/Mn^{++} /NADH + pHAP nicht.

2.3.6. System Xanthin/Xanthin-Oxidase im Crocin-Bleichungsansatz

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer, pH=7,8 100 mM XOD 0,1 U
 Xanthin 0,5 mM Crocin 6 μM

Vom System Xanthin/Xanthin-Oxidase ist bekannt, daß es in der Lage ist, Superoxidanionen zu produzieren.

Die Vermutung, daß $\text{O}_2^{\cdot -}$ -für die Crocin-Bleichung verantwortlich ist, sollte somit überprüft werden:

Das X/XOD-System allein bleicht kein Crocin.

Auch bei 5-fach höheren Xanthin- bzw. XOD-Konzentrationen konnte keine Abnahme des Carotinoids festgestellt werden.

B. PEROXIDASE - KATALYSIERTE ABBAUREAKTIONEN

1. Indolessigsäure-Abbau durch POD

1.1. Messung des Sauerstoff-Verbrauchs

1.1.1. Einfluß des pH-Wertes

	pH= 5.7	pH= 6.5	pH= 7.8
Grundreaktion: POD / IAA	31	14	3
Stimulation : pHAP	243	165	15

Ansatz (2 ml): P-Puffer 100 mM H₂O ad 2 ml
 IAA 0,5 mM POD 5 U
 pHAP 0,5 mM Temperatur: 25° C
 max. O₂-Sättigung = 506 n mol O₂/2 ml

Tab.21: pH-Einfluß auf O₂-Verbrauch durch POD/IAA

Das System Peroxidase-Indolessigsäure nimmt bereits ohne Verstärker pHAP deutlich Sauerstoff auf.

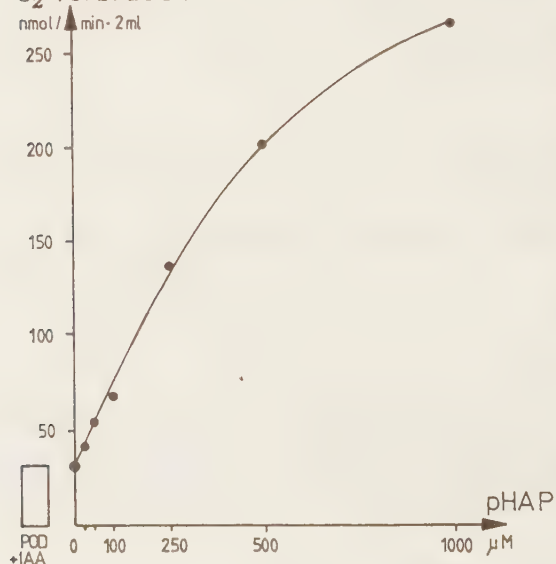
Die Rate des Sauerstoff-Verbrauchs ist bei saurem pH-Wert erheblich größer als im alkalischen Bereich.

Durch Zusatz des Phenols pHAP erhöht sich der Verbrauch um den Faktor 7,8 bei pH = 5,7, um 11,8 bei pH = 6,5 und um den Faktor 5 bei pH = 7,8.

Eine Verdopplung der IAA-Konzentration, wie auch der POD-Konzentration, führt zu einer Verdopplung der O₂-Aufnahmerate.

1.1.2. Stimulation durch p-Hydroxyacetophenon

O₂-Verbrauch



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer,
 pH = 5,7 100 ml
 POD 5 U
 IAA 0,5 mM
 pHAP 25-1000 μM
 Temperatur: 25° C
 = 506 n mol O₂/2 ml/min.

n mol Ethylen/ Ansatz
 POD 0
 IAA 0
 POD/pHAP 0

Abb.44: pHAP-Einfluß auf O₂-Zehrung durch POD-IAA

Die deutliche Sauerstoffzehrung durch POD/IAA wird ab 25 μM p-Hydroxyacetophenon meßbar stimuliert. Über einen weiten Bereich verläuft die Erhöhung linear mit der pHAP-Konzentration; die Sättigung liegt deutlich über 1 mM pHAP. Bei alkalischem pH-Wert erfolgt nur eine geringe Verstärkung, die Konzentrationsabhängigkeit zeigt bereits früher Sättigungseffekte.

1.1.3. Einfluß von HSO_3^- auf die Sauerstoff-Zehrung

SYSTEM	n mol O_2 / 2 ml · min
HSO_3^-	0
HSO_3^- + POD	3
POD + IAA	43
POD + IAA + HSO_3^-	144
POD + IAA + pHAP	191
POD + IAA + pHAP + HSO_3^-	331

Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer,
 pH = 5,7 100 mM
 POD 5 U
 IAA 0,5 mM
 HSO_3^- 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 Temperatur: 25° C
 506 n mol O_2 / 2 ml · min

Tab.22: HSO_3^- -Einfluß auf den O_2 -Verbrauch

Bei pH = 5,7 nimmt die HSO_3^- -Lösung allein keinen Sauerstoff auf, mit Peroxidase ist die Zehrung nur geringfügig. Dagegen steht die schnelle Sauerstoffreduktion durch POD/ HSO_3^- bei alkalischem pH = 7,8 von 200 n mol: Die Grundrate durch POD/IAA wird um das 3,4-fache durch HSO_3^- verstärkt; die schon sehr hohe Rate der Reaktion POD/IAA/pHAP nochmals um das 1,7-fache. Somit wird eine nur im Alkalischen Sauerstoff-verbrauchende Reaktion im sauren Milieu zum Verstärker. Interessant ist die Beobachtung, daß bei IAA-Zugabe nach POD/ HSO_3^- der beschriebene HSO_3^- -Verstärkungseffekt ausbleibt (vorheriger Abbau)!

1.1.4. Crocin-Beeinflussung der POD/IAA-Reaktion

SYSTEM	Sauerstoff-Verbrauch: nmol O_2 / 2 ml		
	pH= 5.7	pH= 6.5	pH= 7.8
POD + IAA	31	14	3
↓ ↓ + Crocin	134	59	1
POD + IAA + pHAP	243	165	15
↓ ↓ + Crocin	276	214	1

Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer,
 pH=5,7/6,5/7,8 100 mM
 POD 5 U
 IAA 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 Crocin 10 μM

Tab.23: Crocin-Einfluß auf POD-IAA

Crocin nimmt bei keinem pH-Wert mit Peroxidase allein Sauerstoff auf. Bei saurem pH-Wert verstärkt die Zugabe von Crocin die Sauer-

stoff-Zehrung durch POD-IAA bzw. durch POD-IAA + pHAP (Faktor 4,3 bei pH = 5,7/ 3,1 bei pH = 6,5).
Im Alkalischen wird die geringe O₂-Reduktion durch Crocin deutlich abgesenkt.

1.1.5. Einfluß von Hemmstoffen auf die Sauerstoff-Aufnahme

Hemmstoff	nmol O ₂ / 2 ml · min			
	POD - IAA		POD - IAA - pHAP	
	—	+ Hemmstoff	—	+ Hemmstoff
Katalase	53	52	223	165
SOD	63	67	223	202
Propylgallat	52	0	224	0
Ascorbat	56	0	224	6
Mannit	43	44	177	172
Formiat	50	55	177	177

Ansatz:	Phosphatpuffer, pH = 5,7	100 mM	Ascorbat	0,5 mM
	POD	50/2 ml Ansatz	Mannit	1 mM
	IAA	0,5 mM	Formiat	1 mM
	pHAP	0,5 mM		
	Katalase	100U/2 ml Ansatz		
	SOD	100U/2 ml Ansatz		
	Propylgallat	0,5 mM		

Tab.24: Hemmstoff-Einfluß auf die Sauerstoff-Zehrung

Der Sauerstoffverbrauch durch den peroxidativen Indolessigsäureabbau bei pH = 5,7 wird durch Katalase nicht beeinflusst. Die Hemmwirkung von KAT auf die pHAP-verstärkte Reaktion ist gering - sie liegt dazu im oberen Meßbereich der O₂-Elektrode. Superoxid-Dismutase kann die Grundreaktion, wie auch die stimulierte Reaktion, nicht abschwächen. Demgegenüber steht die totale Hemmung des universellen Radikal-Scavangers Propylgallat. Ebenso unterbleibt jegliche Sauerstoff-Zehrung durch POD/IAA bzw. POD/IAA + pHAP bei Anwesenheit von Natriumascorbat. Die beiden "spezifischen" OH·-Radikal-Fänger Formiat und Mannit zeigen auf keinen der beiden Reaktionstypen Hemmwirkungen.

Ascorbat besitzt allein die Fähigkeit der Reduktion des Sauerstoffs, allerdings in geringem Maße: 6 n mol.

1.1.6. Einfluß der Reaktionsprodukte aus POD-IAA

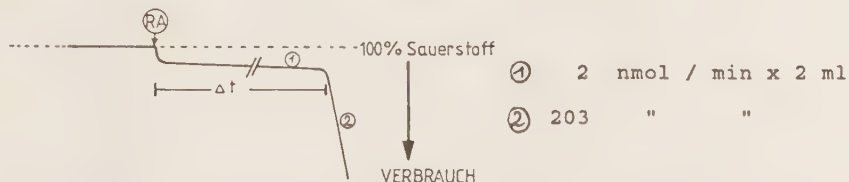
Im folgenden wurde untersucht, ob der Reaktionsansatz Peroxidase + IAA nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten noch in der Lage war Sauerstoff zu reduzieren.

Reaktionsansatz:

Phosphatpuffer, 100 mM
pH = 5,7
IAA 2 mM
POD 10 U

Q-Elektrode:

Phosphatpuffer, 100 mM
pH = 5,7
500 µl Reaktionsansatz
H₂O ad 2 ml



Nach der Zugabe des Reaktionsansatzes folgte zunächst eine Phase, in der kein Sauerstoffverbrauch zu beobachten war. Die Dauer dieses Plateaus stand mit der Vorinkubationszeit in Beziehung:

Vorinkubationszeit (min)	t (min)
30	6
60	11
130	18
180	44

Tab. 25: Abhängigkeit des Plateaus von der Vorinkubationszeit

Durch POD-Zugabe während des Plateaus konnte t verkürzt werden. Der anschließende Verbrauch war nahezu konstant; bei sehr langen Vorinkubationszeiten (12 Std.) war kein Verbrauch zu beobachten.

1.1.7. Tryptophan und Peroxidase

Bei Verwendung bestimmter Konzentrationen sind Tryptophan (0,5 mM) und Peroxidase (10 U) nicht in der Lage Sauerstoff zu verbrauchen. Die Zugabe des Monophenols pHAP oder die Veränderung des pH-Wertes (5,7 - 6,5 - 7,8) haben keinen Einfluß.

1.2. HPLC-Trennung der IAA-Abbauprodukte

1.2.1. Identifizierung der Abbauprodukte

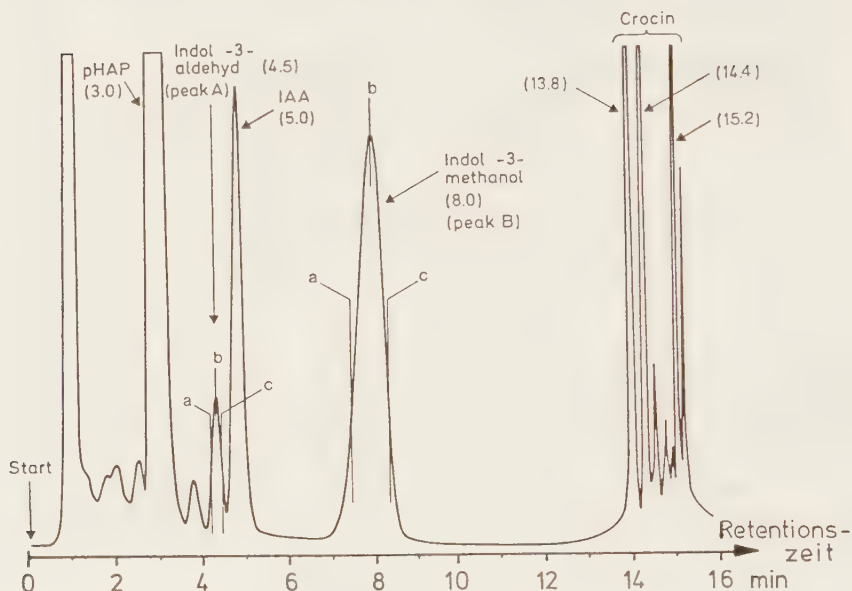


Abb.45: HPLC-Chromatogramm eines Reaktionsansatzes nach einer Minute

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH=7,8	100 mM	POD	10 U
IAA	0,5 mM	pHAP	0,5 mM
Crocin	10 µM		

Bedingungen: 40 % MeOH (+ 0,2 % Eisessig)

60 % H₂O Detektion: 280 nm/ 0.05

ab 10 Min.: 80 % MeOH (in 5 Min.) Detektion: 436 nm/ 0.005

Abbildung Nr.45 zeigt das Chromatogramm eines Gesamtreaktionsansatzes (POD - IAA - pHAP - Crocin) mit dem Hauptprodukt Indol-3-Methanol (83 %) und dem Indol-3-Aldehyd (8%).

Die angegebenen Bedingungen wurden gewählt, um innerhalb relativ kurzer Zeit (20 Minuten) eine Trennung durchführen zu können, aber dennoch ausreichende Trennleistungen zu erhalten.

Durch die Ansäuerung des Laufmittels konnte der IAA-peak auf 5 Minuten Retentionszeit verzögert werden, da er sonst mit dem Injektions-peak bei 1 Minute zusammenfallen würde.

Zur Identifizierung wurde das Reaktionsgemisch (ohne pHAP und Crocin) nach 30 Minuten Reaktionszeit getrennt, die peaks A und

B fraktioniert, durch Wiederholung angereichert und anschließend das UV-Spektrum aufgenommen.

Vergleichssubstanzen wurden cochromatographiert und zugeordnet. Eine deutlich elegantere Methode ergab sich durch Verwendung eines Photodioden-Array-Detektors und anschließender Computerauswertung (Waters 990/siehe M + M).

Während der Trennung eines Gemisches wird alle 0.8 sek. ein Spektrum (Auflösung 1,4 nm) über den Bereich 230-350 nm aufgenommen. Somit erhält man neben dem 2-dimensionalen Chromatogramm (Zeit/Extinktion) noch als 3. Koordinate den gewünschten Wellenlängenbereich.

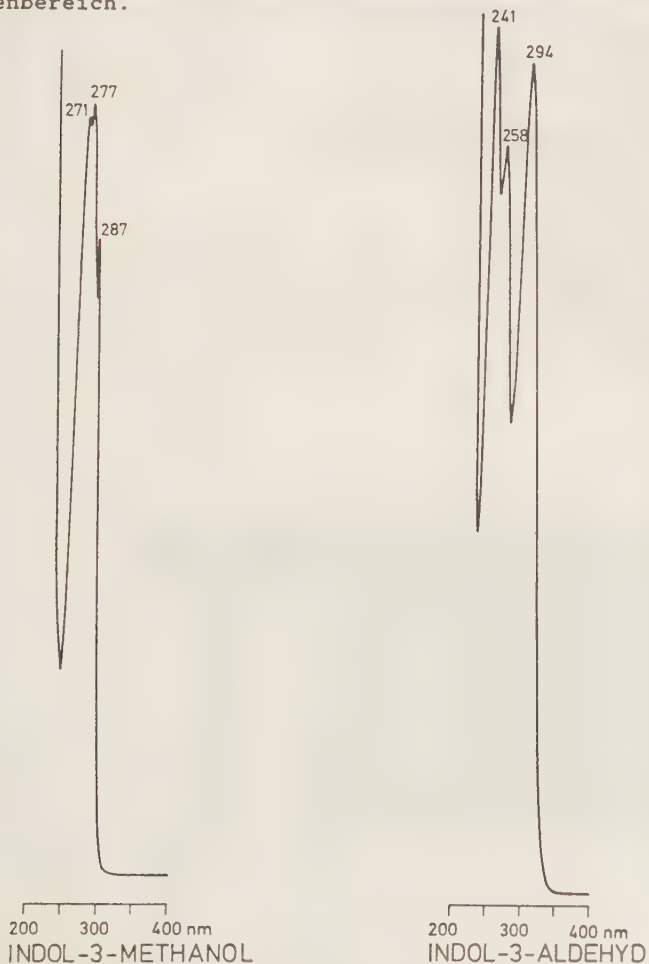
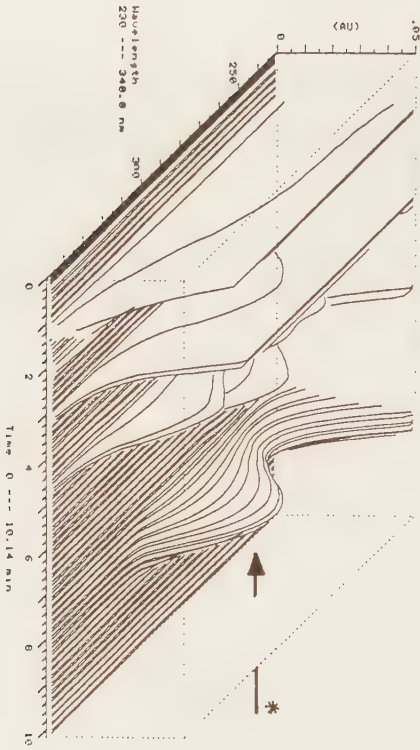


Abb.46: UV-Spektren von IM und IA

2 mögliche "Blickrichtungen" auf

3-D - plot

Waters 290
322 Three dimensional plot 818



* Blick auf Chromatogramm
aus Richtung 8-Minuten - Peak

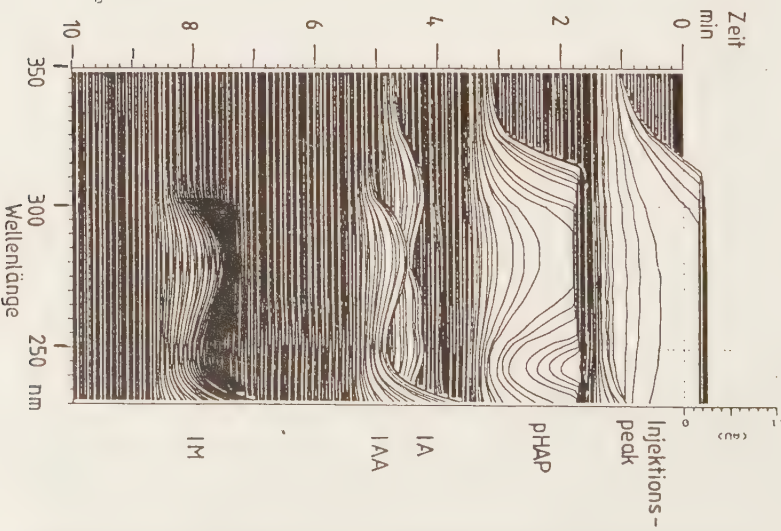
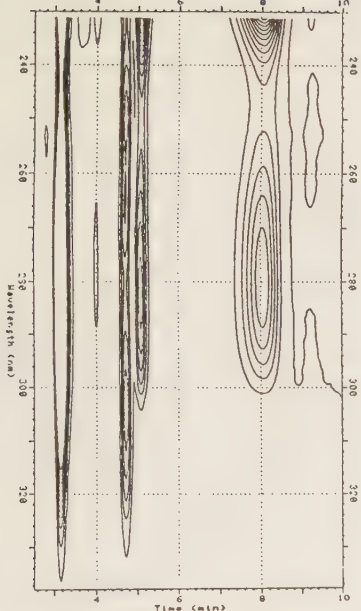


Abb.47: Zwei mögliche "Blickrichtungen" auf 3-D-plot

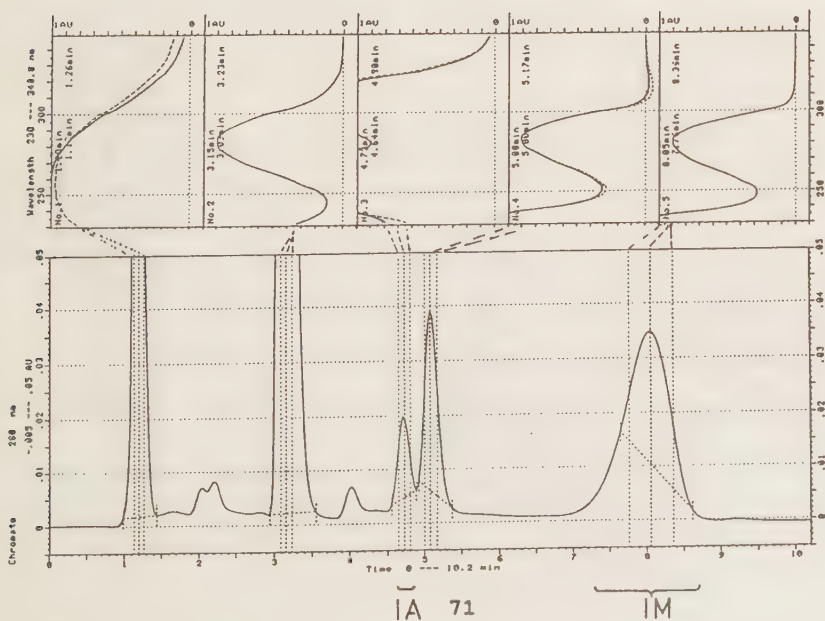


Neben den sehr anschaulichen 3-D-plots bzw. der "Aufsicht" (= contour plot) ist es möglich, zu gewünschten Zeiten Spektren herauszuheben. Die zwei zu identifizierenden peaks wurden jeweils an drei Zeitpunkten (vor/Maximum/nach) des Chromatogramms geschnitten, die Spektren a, b, c herausgenommen und in einem "Spektrum" übereinander geordnet. Anschließend wurde die Vergleichssubstanz ebenfalls "getrennt", zu drei Zeiten (d, e, f) Spektren aufgenommen und mit den drei Spektren a, b, c in einer Darstellung verglichen.

Abb.48: Contour-plot der Trennung

Durch einen Rechenvorgang ist es möglich, die unterschiedliche Extinktion der einzelnen Spektren aufeinander anzugleichen (im Maximum) und ebenfalls in einer Darstellung abzubilden: Da in beiden Fällen peak und Standard identische Verbindungen darstellen, wurde aus jeweils sechs unterschiedlich hohen Spektren ein einheitliches erhalten.

Abb.49: Chromatogramm des IAA-Abbaus durch POD-pHAP nach 1 Minute
 Injektionspeak pHAP IA IAA IM



INDOL-3-ALDEHYD

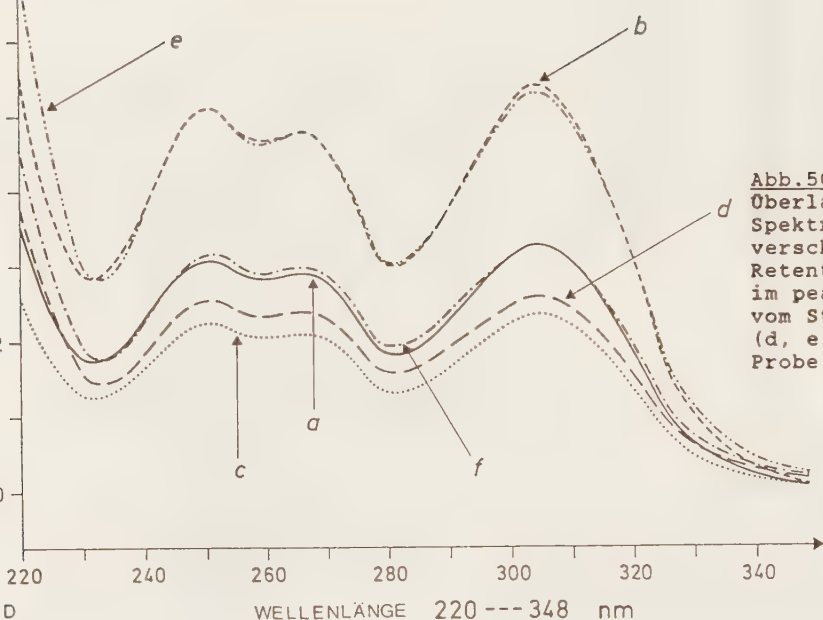


Abb. 50:
Überlagerung der
Spektren drei
verschiedener
Retentionszeiten
im peak A sowohl
vom Standard
(d, e, f) als auch
Probe (a, b, c)

INDOL-3-METHANOL

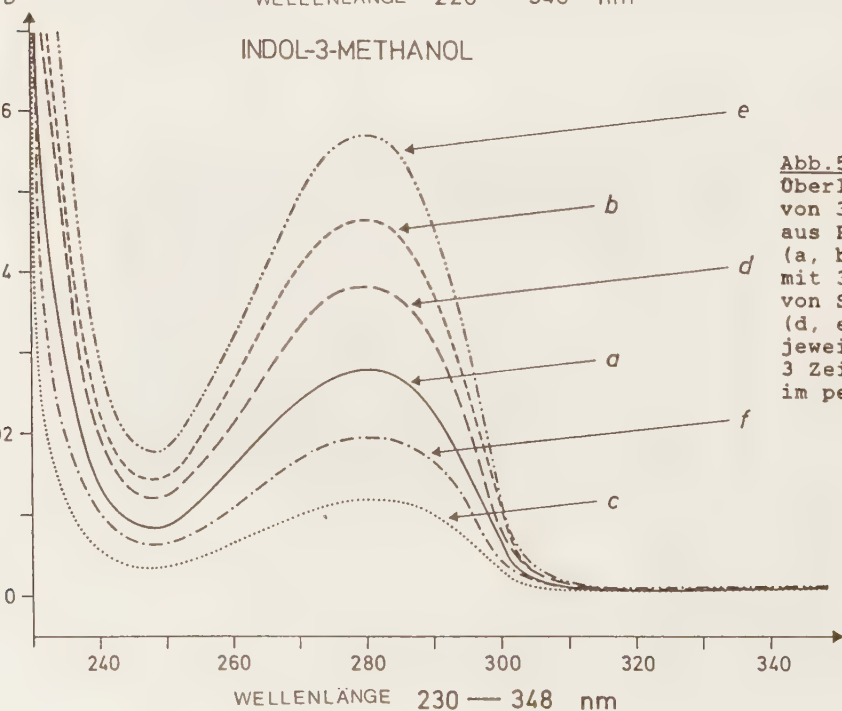


Abb. 51:
Überlagerung
von 3 Spektren
aus Probe
(a, b, c)
mit 3 Spektren
von Standard
(d, e, f) zu
jeweils
3 Zeitpunkten
im peak B

1.2.2. Einfluß des pH-Wertes

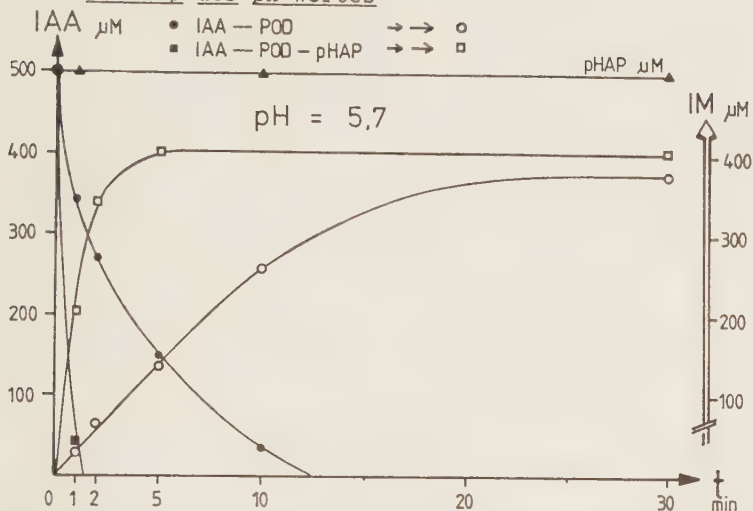
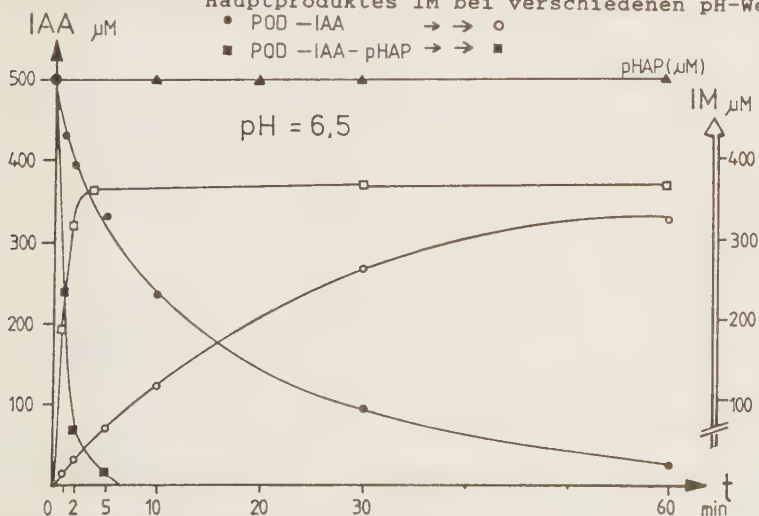
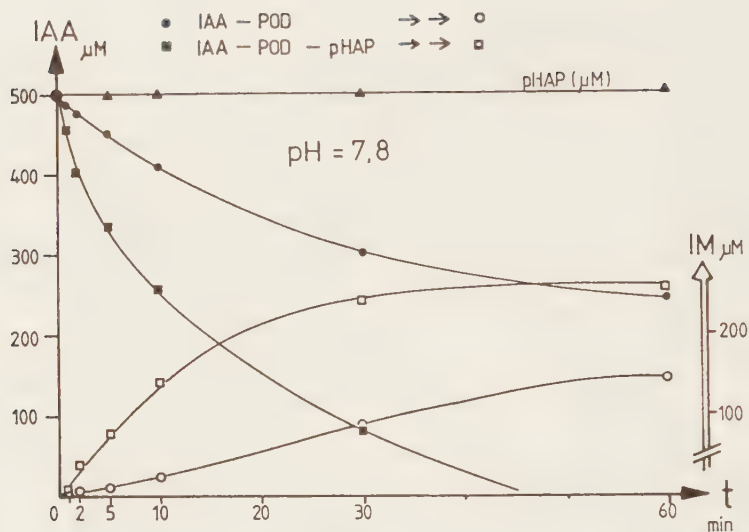


Abb.52/53/54: Kinetik des IAA-Abbaus und der Bildung des Hauptproduktes IM bei verschiedenen pH-Werten



Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer, pH = 5,7/6,5/7,5 100 mM H_2O ad 2 ml
 POD 10 U IAA 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
Bedingungen: 40 % MeOH (0,2 % Eisessig)
 280 nm/range 0,05 flow: 1 ml/min



Der Abbau der Indoleessigsäure durch POD zeigt eindeutige Säurekatalyse: während bei pH = 5,7 nach 10 Minuten nahezu völliger Abbau erfolgt, werden bei 6,5 60 Minuten benötigt; bei pH = 7,8 liegen nach 60 Minuten noch 50 % IAA vor.

Deutlich beschleunigt wird der peroxidative IAA-Abbau durch pHAP: Die Zeit bis zum vollständigen Abbau beträgt bei pH = 5,7 1,5, bei pH = 6,5 6 und bei pH = 7,8 ca. 45 Minuten.

Bei der Bildung des Hauptproduktes Indol-3-Methanol verhält es sich genauso: IM entsteht im sauren Milieu erheblich rascher als im basischen. Das Monophenol pHAP bewirkt eine deutliche Beschleunigung der IM-Bildung; pHAP selbst wird aber nicht abgebaut.

1.2.3. Stimulation durch p-Hydroxyacetophenon

Tab.26: pHAP-Konzentrationseinfluß auf IAA-Abbau durch POD

Reakt. zeit (min)	GRUNDREAKTION IAA - POD	IAA - KONZENTRATION (μM)							
		pHAP - stimulierte Reaktion (μM)							
		5	10	25	50	100	250	500	1000
0	500	500	500	500	500	500	500	500	500
0,5	410	403	397	356	340	332	279	254	177
1	387	368	350	333	328	307	210	150	58
2	310	298	284	246	209	161	101	36	—
5	156	154	143	137	77	38	—	—	—
10	74	40	24	16	7	—	—	—	—

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer,

pH=5,7	100 mM	POD	10 U
IAA	0,5 mM	pHAP	5-1000 μ M
40 % MeOH (0,2 % Eisessig)		1 ml/ min	
280 nm / 0,05 range			
Hypersil - ODS - 5 μ		125 x 4 mm	

Der Vergleich der IAA-Konzentration nach 2 Minuten Reaktionszeit bei den unterschiedlichen pHAP-Konzentrationen zeigt direkt die Abhängigkeit der Stimulation des IAA-Abbaus vom Phenol.

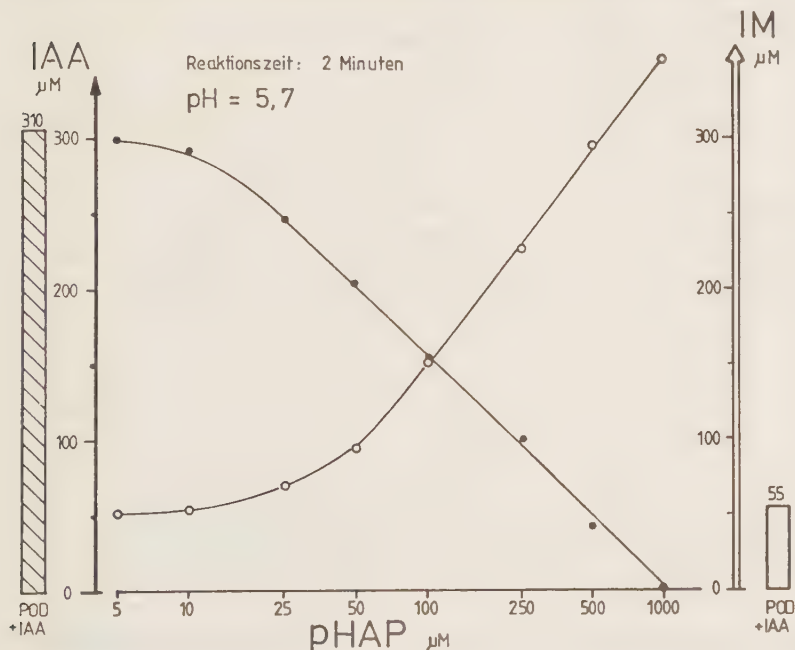


Abb. 55: IAA--Abbau und IM-Bildung in Abhängigkeit der pHAP-Konzentration

Durch die Darstellung der pHAP-Abhängigkeit in log. Form erscheint der sigmoide Kurvenverlauf über einen weiten Konzentrationsbereich als Gerade.

Der Abbau von IAA geht parallel mit der Bildung des Hauptproduktes IM.

Die Wahl des 2-Minuten-Zeitpunktes erwies sich als günstig, da die Grundreaktion POD-IAA erst 38 % IAA abgebaut bzw. 11 % IM gebildet hat; die maximal eingesetzte pHAP-Konzentration stimuliert dagegen den Abbau auf 100 %, die IM-Bildung auf 71 %.

Interessant ist die Beobachtung, daß die eingesetzte pHAP-Konzentration nach IAA-Abbau (und auch später) unverändert vorliegt.

1.2.4. Picein im POD-IAA-System

		REAKTION						
		POD - IAA		POD - IAA + PICEIN			POD - IAA + pHAP	
		REAKTIONSPRODUKTE (µM)						
t (min)	IAA	IM	IAA	IM	PICEIN	IAA	IM	pHAP
0	500	—	500	--	500	500	--	500
0.5	436	12	425	12	500	231	85	500
1	399	25	395	27	500	141	162	500
2	328	48	328	48	500	16	237	500
5	197	92	198	87	500	---	291	500

Picein - Vorinkubation mit Cellulase

t (min)	PICEIN	pHAP
0	500	---
1	416	28
5	316	175
10	145	358
20	14	471
30	---	500

2-Minuten-Ansätze

IAA - POD + PICEIN (Cellulase)

Vorinku- bationszeit (min)	IAA (µM)	IM (µM)
0	325	38
1	271	59
5	204	94
10	121	130
15	99	152
20	81	188
30	45	199

Abb.56: IAA-Abbau durch POD/POD-pHAP/POD-Picein/POD-Picein + Cellulase

Reaktionsansatz (2ml)

Phosphatpuffer, pH=5,7 100 mM
 POD 10 U
 IAA 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 Picein 0,5 mM

100 µl

Vorinkubation (2ml)

P-Puffer, pH=5.7 100 mM
 Cellulase 10 U
 Picein 10 mM
 H₂O ad 2 ml
 Vorinkubation 36° C

Der Vergleich der drei Reaktionstypen zeigt, daß die Grundreaktion POD-IAA und die Reaktion POD-IAA-Picein keinen Unterschied in der IAA-Abbaugeschwindigkeit zeigen; dem gegenüber steht die stark beschleunigte Reaktion durch pHAP-Zusatz.

Cellulase baut innerhalb von 30 Minuten Picein (●) vollständig zu pHAP (○) ab.

Aus diesem Cellulase-Ansatz wurden zu verschiedenen Zeiten je 100 µl zur POD-IAA-Reaktion zugegeben und nach 2 Minuten Reaktionszeit

IAA und IM bestimmt. Mit zunehmender Cellulase- Vorinkubation sanken die IAA-Minutenwerte (■) auf annähernd den Wert der pHAP-verstärkten Reaktion; entsprechend stieg die Indol-3-Methanol-pHAP-Konzentration ist somit für den zunehmenden IAA-Abbau bzw. die IM-Bildung verantwortlich.



Abb.57: Einfluß der Vorinkubationszeit auf Picein-Abbau und pHAP-Bildung sowie IAA-Abbau und IM-Bildung nach 2 Minuten POD-Reaktion

1.2.5. Trennung des Ansatzes POD-IAA-CROCIN

Reaktionszeit	(µM) IAA	(µM) IM	CROCIN (areas / bei t=0= 8.1 µM)					
			I	II	III	IV	V	VI
0	500	---	961	547	69	62	288	114
1	379	50	304	186	34	25	76	48
2	280	83	115	72	16	17	37	22
5	126	176	10	9	6	5	10	7
10	22	243	-----					
30	---	303	-----					

Ansatz:

Phosphatpuffer, pH = 5.7	100 mM
IAA	0.5 mM
POD	10U/2ml Ansatz
Crocin	8.1 µM

Tab.27: IAA- und Crocin-Abbau durch POD

Die Anwesenheit von Crocin im Grundansatz POD + IAA hatte auf die Abbaugeschwindigkeit von IAA keinen Einfluß. Das Chromatogramm (Abb. 45) zeigt bei 436 nm 6 peaks für Crocin, die unter obigen Bedingungen schneller als IAA abgebaut wurden. Beim pHAP-beschleunigten Reaktionsansatz trat gegenüber dem System ohne Crocin keine Veränderung auf: Nach 2 Minuten war IAA, aber auch Crocin völlig abgebaut. Die Änderung des pH-Wertes auf 7,8 zeigte entsprechend langsamen Abbau, allerdings keinen Unterschied zum Ansatz ohne Crocin.

Exakte und detaillierte Untersuchungen über Crocin-Abbauvorgänge wurden deshalb im Photometer verfolgt.

1.2.6. Hemmstoff-Wirkung auf den Abbau von IAA und Crocin

Hemmstoffe	IAA (μ M)		CROCIN (μ M)	
	Reaktionszeit (min)		Reaktionszeit (min)	
	0	5	0	5
- KAT	500	156	8.12	0.86
+ KAT (100 U)	500	181	8.12	0.90
- SOD	500	109	8.12	0.91
+ SOD (100 U)	500	91	8.12	0.95
- PG	500	108	8.12	0.98
+ PG (0.5 mM)	500	508	8.12	8.10
- Asc	500	162	8.12	1.02
+ Asc (0.5 mM)	500	472	8.12	7.84
- Man	500	165	8.12	0.65
+ Man (0.5 mM)	500	145	8.12	0.62
- For	500	163	8.12	0.45
+ For (0.5 mM)	500	127	8.12	0.45

Ansatz (ml):

Phosphatpuffer,
pH = 5,7 100 mM
POD 10 U
IAA 0,5 mM
pHAP 0,5 mM
Crocin 8,1 μ M
KAT 100 U
SOD 100 U
Asc 0,5 mM
PG 0,5 mM
Mannit 0,5 mM
Formiat 0,5 mM

Tab.28: Hemmstoffeinfluß auf IAA- und Crocin-Abbau

Zum Zeitpunkt 5 Minuten sind bereits 72 % IAA durch POD abgebaut; er eignet sich als Vergleichsmeßpunkt für die Hemmwirkung.

Völlige Hemmung des IAA- und auch Crocin-Abbaus zeigen Ascorbat und Propylgallat.

Ohne Einfluß bleiben die "Schutzenzyme" SOD und KAT sowie die OH-Fänger Mannit und Formiat.

Die grundsätzlich gleichen Effekte zeigten die durch pHAP-verstärkten Reaktionen, allerdings innerhalb kürzerer Zeit.

1.2.7: Vergleich: IAA-Abbau durch POD/POD-Mn²⁺ /POD-H₂O₂

1.2.7.1. IAA - POD - Mn²⁺ ± pHAP

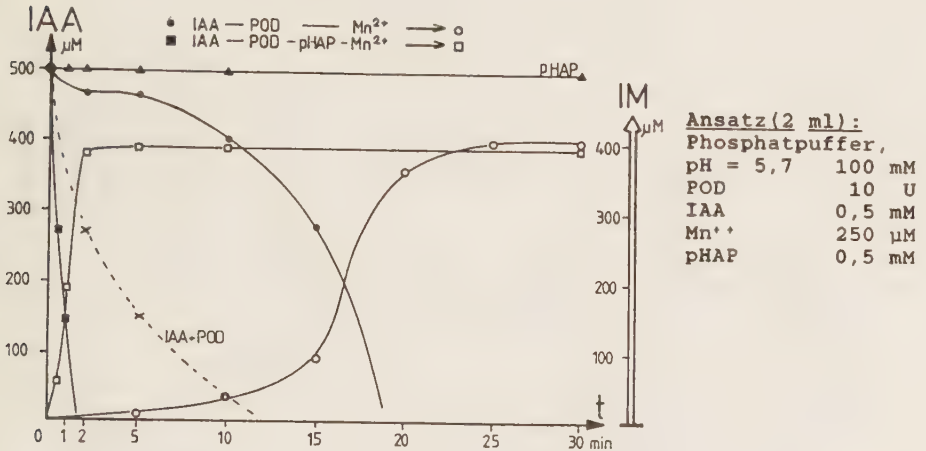
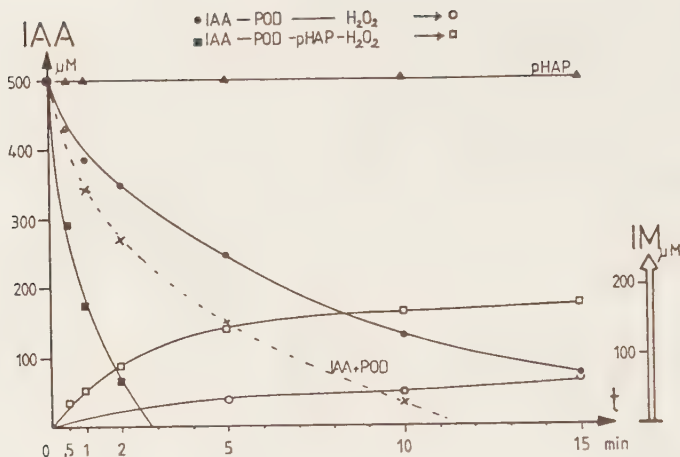


Abb. 58: Mangan²⁺-Wirkung auf IAA-Abbau

Der Verlauf des IAA-Abbaus durch POD/Mn²⁺ zeigt eine deutlich verlangsamte Reaktion (●) gegenüber dem Abbau durch POD allein. Ebenso setzt die Bildung von IM (O) mit Verzögerung ein, um dann aber sehr rasch anzusteigen. Die Absenkung von Mn²⁺ auf 50 μM führt zu keiner wesentlichen Beschleunigung des IAA-Abbaus. Die durch pHAP (■) verstärkte Reaktion unterscheidet sich unwesentlich von der Reaktion IAA-POD-pHAP (ohne Mn²⁺). Auch nach Mangan²⁺-Zusatz wird pHAP nicht abgebaut!

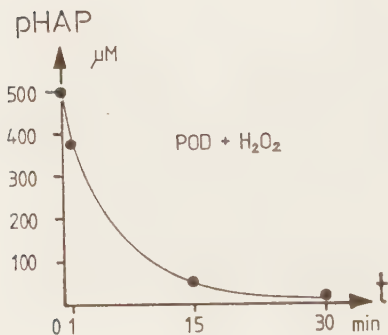
1.2.7.2. System: POD - IAA- H₂O₂ ± pHAP

H₂O₂ verzögert die IAA-Oxidation durch POD. Die Verlangsamung ist nicht so ausgeprägt, wird durch Mn²⁺-Zusatz aber deutlich. Durch pHAP wird die Reaktion beschleunigt, allerdings langsamer als bei der Grundreaktion. Interessant ist die Rolle von pHAP: auch durch H₂O₂ wird pHAP nicht verändert, wenn noch eine weitere reduzierte Verbindung anwesend ist. Durch POD-IAA-H₂O₂ erfolgt kein pHAP-Abbau, dagegen durch POD-H₂O₂ ein rascher!



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer,
 pH = 5,7 100 mM
 POD 10 U
 IAA 0,5 mM
 H₂O₂ 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM

Abb. 59: H₂O₂-Einfluß auf IAA-Abbau



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer,
 pH = 5,7 100 mM
 POD 10 U
 H₂O₂ 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM

Abb. 60: pHAP-Abbau durch POD-H₂O₂

Auffallend ist, die sehr geringe Konzentration des gebildeten Hauptproduktes Indol-3-Methanol (○/□). In annähernd gleicher Konzentration fällt ein noch nicht identifiziertes Produkt (ret.t.: 2 Min.) an, das beim Abbau nur durch Peroxidase unter 1 % vorliegt. Somit dürfte sich der vorliegende Abbau-mechanismus vom bisherigen unterscheiden.

1.2.8. Einfluß von Bisulfit auf den IAA-Abbau

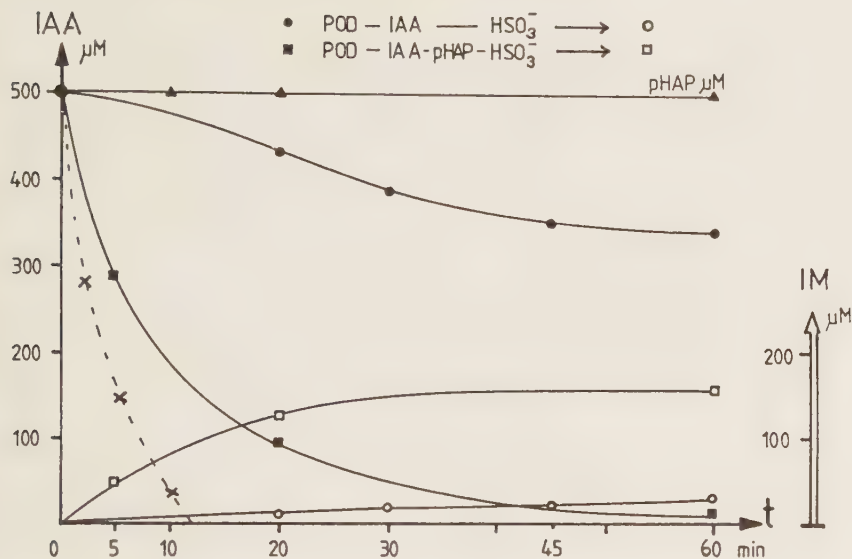


Abb. 61: HSO₃⁻-Einfluß auf IAA-Abbau durch POD ± pHAP

Ansatz/2 ml:

Phosphatpuffer,			
pH = 5,7	100 mM	IAA	0,5 mM
pHAP	0,5 mM	HSO ₃ ⁻	0,5 mM
POD	10 U		

Gegenüber der Grundreaktion POD-IAA ist die Reaktion unter HSO₃⁻-Einfluß fast vollständig gehemmt. Erst nach einer Stunde sind 32 % IAA abgebaut.

Ebenso ist die Indolmethanol-Bildung stark gehemmt. Zwar wirkt pHAP drastisch beschleunigend auf POD-IAA-HSO₃⁻; gegenüber der Reaktion ohne HSO₃⁻ ist der IAA-Abbau aber sehr viel langsamer.

Auch in diesem System bleibt die eingesetzte p-Hydroxyacetophenon-Konzentration unverändert. Die gebildete IM-Konzentration liegt auch nach völligem IAA-Abbau unterhalb der IM-Konzentration aus POD-IAA bzw. POD-IAA-pHAP.

HSO_3^- - Einfluß auf Gesamtansatz : POD - IAA - pHAP - Crocin

t (min)	HSO_3^- 500 μM bei t = 0	IAA (μM)	IM (μM)	pHAP (μM)	C R O C I N (areas/bei t = 0 : ± 15,4 μM)					
					peak Nr. I	II	III	IV	V	VI
0	---	500	---	500	965	543	66	27	121	141
2	---	---	239	500	---	---	---	---	---	---
	+	457	---	500	503	282	43	24	90	49
5	---	---	287	500	---	---	---	---	---	---
	+	376	18	500	23	22	15	11	15	16
10	+	187	80	500	---	---	---	---	---	---
15	+	145	87	500	---	---	---	---	---	---
45	+	---	139	500	---	---	---	---	---	---

Ansatz:

Phosphatpuffer, pH = 5.7 100 mM
 POD 10 U/2 ml Ansatz
 IAA 0.5 mM
 pHAP 0.5 mM
 Crocin 154 μM
 HSO_3^-

Tab.29: HSO_3^- -Einfluß auf den Gesamtansatz: POD-IAA-pHAP-Crocin

Durch HSO_3^- -Zusatz im System mit allen Reaktionspartnern ergeben sich deutliche Unterschiede: während erst nach 45 Minuten mit HSO_3^- der IAA-Abbau vollständig ist, läßt sich ohne HSO_3^- schon nach 2 Minuten kein IAA mehr nachweisen. Crocin ist auch noch nach 5 Minuten beim Sulfitansatz meßbar, sonst nicht mehr bei 1 Min.

Die mit kurzer Verzögerung ansteigende IM-Konzentration erreicht mit HSO_3^- nicht den Wert der Grundreaktion, pHAP bleibt unverändert.

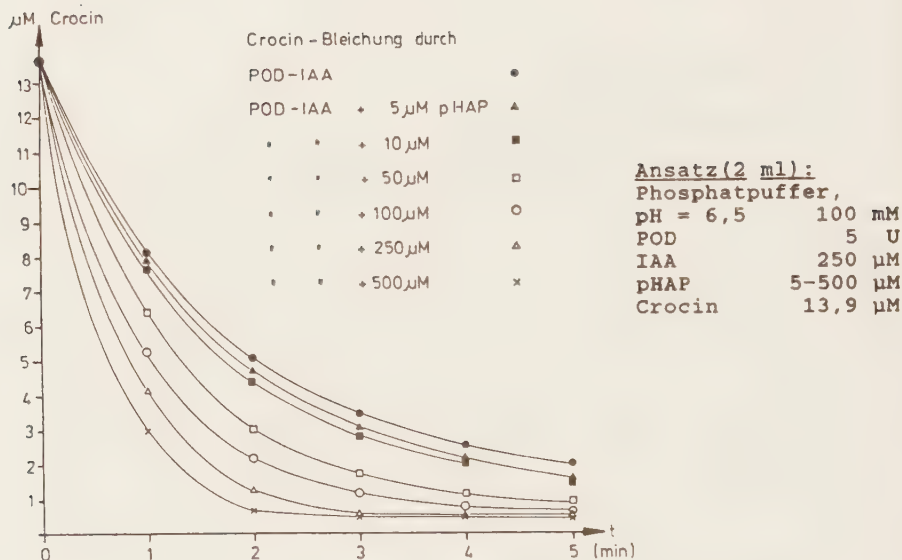


Abb.62: pHAP-Einfluß auf die Crocin-Bleichung durch POD-IAA

Ein Vergleich verschiedener Acetophenone ergab nur bei m- und p-Hydroxyacetophenon deutliche Stimulation der Crocin-Bleichung. Die unphysiologischen Verbindungen Acetophenon und o-HAP (giftige Flüssigkeiten!) zeigten keine Beeinflussung der Grundbleichungsrate durch POD und IAA:

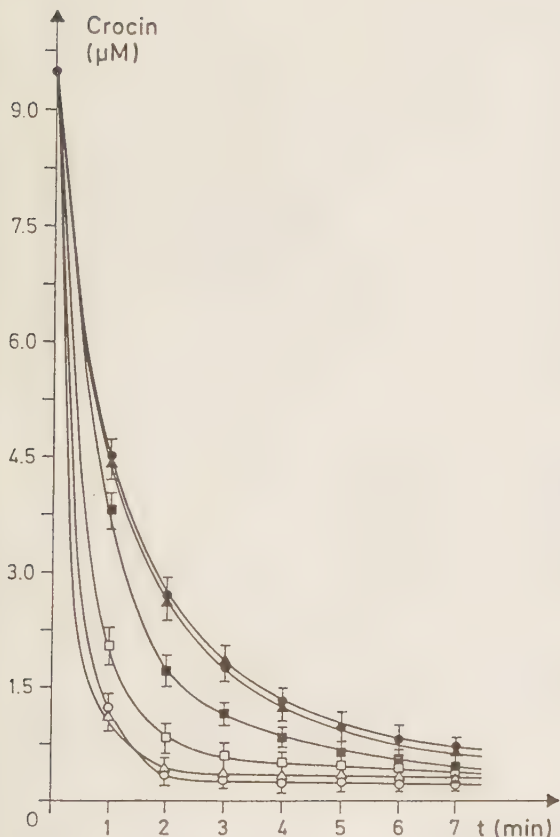
pH = 5,7 (0,5 mM)		%-Bleichung nach 1 Minute,
POD-IAA	—	49
POD-IAA + AP/o-HAP		48
+ m-HAP		66
+ p-HAP		78

Tab.31: Substituenten-Einfluß auf die Bleichungsrate

Picein-Einfluß - Cellulase-Vorinkubation

Die rasche Bleichung durch die Grundreaktion POD/IAA (●) wird durch Picein (▲) nicht beeinflusst. 1 Minute Vorinkubation von Picein mit Cellulase zeigt eine deutliche Stimulation des Abbaus. Nach 60 Minuten Cellulase-Reaktion hat die Verstärkerwirkung des Vorinkubationsansatzes die Intensität der entsprechenden pHAP-Konzentration erreicht.

Anmerkung: folgender Ansatz wurde 5-fach durchgeführt



Bleichungsansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 5,7 100 mM
 POD 5 U
 IAA 250 μM
 pHAP 0,5 mM
 Picein 0,5 mM
 Crocin 7,1 μM

Cellulase-
Vorinkubation (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 5,7 100 mM
 Cellulase 20 U
 Picein 10 mM
 für Bleichung eingesetzt: 100 μl

Vorinkubationszeiten:

t = 0 Min. (▲)
 t = 1 Min. (■)
 t = 10 Min. (□)
 t = 60 Min. (Δ)
 ohne pHAP (●)
 mit pHAP (○)

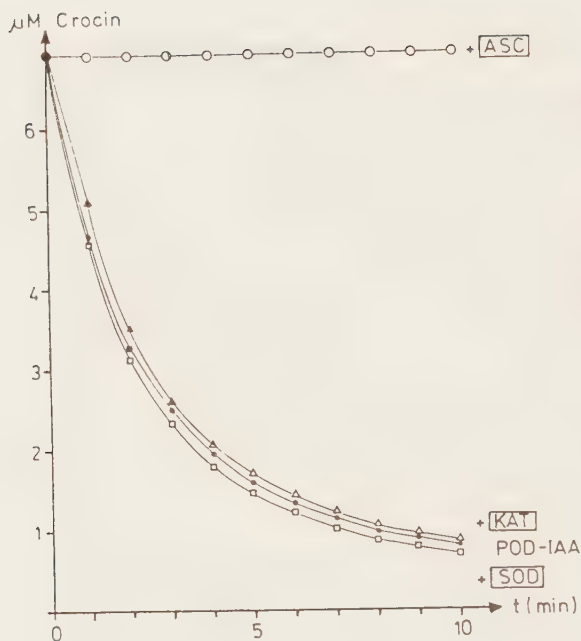
Abb. 63: Einfluß von pHAP/Picein/Picein + Cellulase auf die Crocin-Bleichung durch POD-IAA

1.3.3. Einfluß von Hemmstoffen

1.3.3.1. Grundreaktion POD-IAA

Die rasche Abbaureaktion des Carotinoids Crocin durch POD-IAA wird durch Ascorbinsäure völlig verhindert; auch nach 30 Minuten ist die Crocin-Konzentration so hoch wie bei den Ansätzen mit Crocin-POD bzw. Crocin-IAA.

Durch die beiden Schutzenzyme SOD bzw. KAT wird die Bleichung nicht beeinflusst.



Ansatz (2ml):

Phosphatpuffer,	
pH = 7,0	100 mM
POD	10 U
IAA	0,5 mM
pHAP	0,5 mM
Ascorbat	0,5 mM
Katalase	100 U
SOD	100 U
Crocin	5,9 μM

Abb.64: Hemmstoff-Wirkung auf Crocin-Bleichung durch
POD - IAA

1.3.3.2. pHAP-verstärkte Reaktion

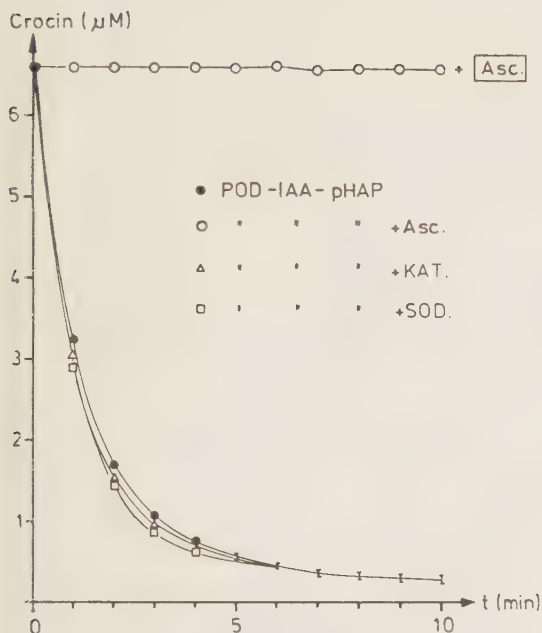
Ebensowenig wie die Grundreaktion, wird die durch p-Hydroxyacetophenon beschleunigte Crocin-Bleichung weder durch Katalase noch durch SOD beeinflusst.

Die Ascorbinsäure verhindert auch hier jeglichen Abbau des Carotinoids.

Auch bei pH ≈ 5,7 zeigt sich, daß weder SOD noch KAT Hemmwirkung auf den Crocin-Abbau durch POD (10 U) und IAA (0,5 mM) haben.

Neben Ascorbat ist auch der universelle Radikalfänger Propylgallat in der Lage, den Pigmentabbau zu verhindern.

Die ·OH-Fänger Mannit und Formiat zeigen keine Beeinflussung.



HEMMSTOFF (Konzentration)	CROCIN (μM)	
	Reaktionszeit 0	5
—	8.12	0.86
KAT (100 U)	8.12	0.90
—	8.12	0.91
SOD (100 U)	8.12	0.95
—	8.12	0.98
PROP (0.5 mM)	8.12	8.10
—	8.12	1.02
ASC (0.5 mM)	8.12	7.84
—	8.12	0.65
MAN (0.5 mM)	8.12	0.52
—	8.12	0.45
PCR (0.5 mM)	8.12	0.45

Tab.32: Hemmstoff-Einfluß
bei pH = 5,7

Abb.65: Hemmstoffe in der
pHAP - verstärkten Reaktion

1.3.4. H₂O₂-Einfluß

pH = 7,0 wurde gewählt, um die Reaktion etwas zu verlangsamen. Durch POD-IAA wird Crocin rasch abgebaut. Die Zugabe von H₂O₂ bewirkt keine Beschleunigung der Reaktion, sondern verzögert diese geringfügig.

Die Enzyme SOD und Katalase haben keinen Einfluß auf den Abbau des Carotinoids.

Ascorbinsäure hemmt die Bleichung, wie auch bei der Grundreaktion, völlig. Während dort die Crocin-Konzentration erhalten bleibt, setzt bei der Reaktion POD-IAA-H₂O₂ nach 8 Minuten rascher Abbau ein. Die schützende Ascorbinsäure wird durch POD-H₂O₂ abgebaut, danach kann die Crocin- Bleichung einsetzen.

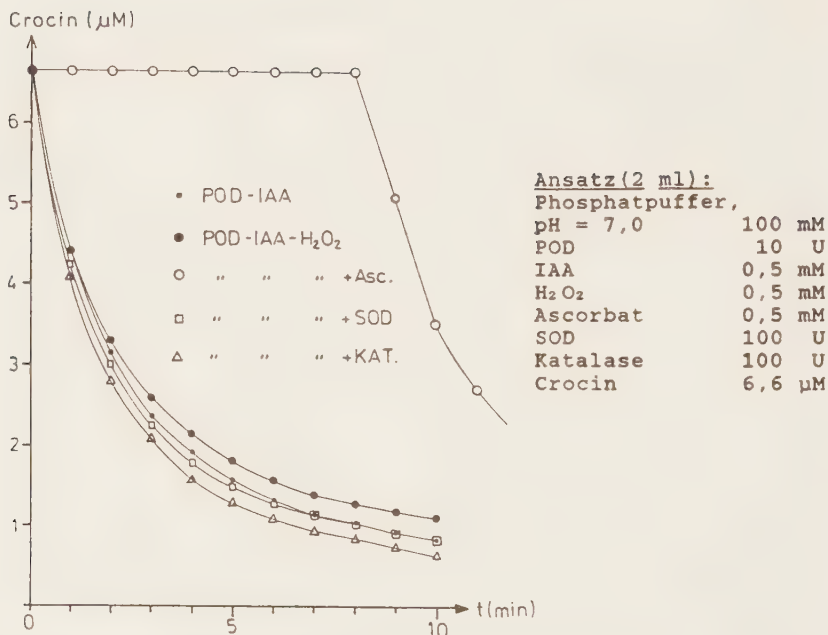


Abb.66: H₂O₂ -Effekt auf die Crocin-Bleichung durch POD-IAA

1.3.5. Einfluß von Bisulfit

Der deutliche Crocin-Abbau durch POD-IAA wird durch HSO₃⁻ sehr stark gehemmt.

Das Enzym Katalase hat auf diese HSO₃⁻ gehemmte Bleichungsreaktion keinen Einfluß.

Superoxid-Dismutase dagegen hebt diesen Sulfit-Hemmeffekt teilweise wieder auf: der Crocin-Abbau erfolgt rascher.

Durch Ascorbat wird auch in HSO₃⁻-Anwesenheit die Bleichung vollständig verhindert.

Durch H₂O₂-Zugabe zum Sulfit-POD-IAA-System wird die durch HSO₃⁻-gehemmte Bleichung total aufgehoben: die Reaktion wird erheblich beschleunigt!

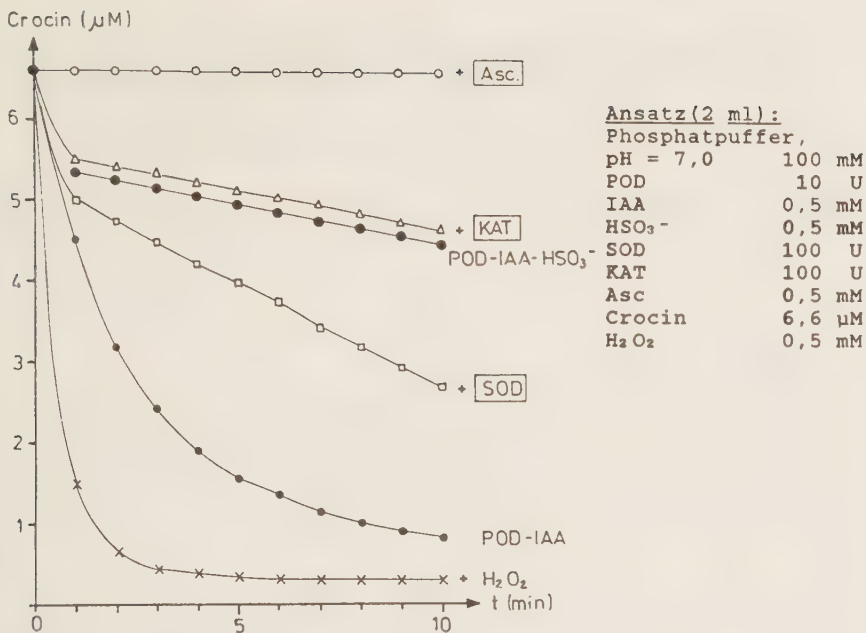


Abb.67: Bisulfit im Bleichungssystem POD-IAA

1.3.6. Einfluß von Mangan²⁺-Ionen

C R O C I N (µM)		
t (min.)	POD-IAA	POD-IAA-Mn ²⁺
0	8,6	8,6
1	2,54	5,07
2	1,39	3,36
3	1,00	2,13
4	0,79	1,49
5	0,63	0,97

Tab.33: Mangan-Wirkung auf POD-IAA

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 5,7	100 mM
POD	10 U
IAA	0,5 mM
Mn ²⁺	50 µM
Crocin	8,6 µM

Mangan²⁺ -Ionen, mit ihrer reduzierenden Eigenschaft, sind in der Lage den Abbau des Carotinoids Crocin zu verzögern. Mangan²⁺-Peroxidase kann alleine keine Bleichung verursachen.

1.3.7. Wirkung der Reaktionsprodukte aus POD-IAA auf die Crocin - Bleichung

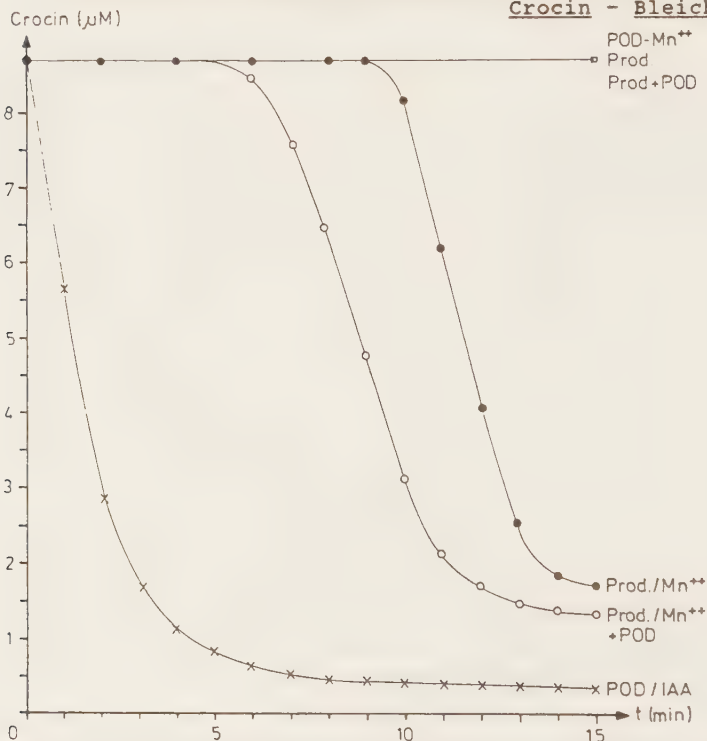


Abb.68: Crocin-Bleichung durch POD und IAA-Abbauprodukte

Bleichungsansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH=5,7	100 mM	POD	10 U
IAA	0,5 mM	Mn ²⁺	50 μM
Crocin	8,8 μM	500 μl Oxidationsansatz	

Oxidationsansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH=5,7	100 mM	POD	10 U
IAA	2 mM	30 min	Reaktionszeit

Indolessigsäure + Peroxidase in hohen Konzentrationen wurden nach 100 Minuten Reaktionszeit im Crocin- Bleichungsansatz eingesetzt: weder mit, noch ohne POD war Bleichung festzustellen.

Nach ca. 8 Minuten ohne Extinktionsabnahme begann plötzlich rascher Crocin-Abbau, wenn im Ansatz Mangan²⁺ vorhanden war. Dieser sprunghafte Abbau setzte etwas früher ein, wenn POD und Mangan²⁺ zum abgereagierten Oxidationsansatz gegeben wurde. Wie schon erwähnt, zeigt POD/Mn²⁺ keine Crocin-Bleichung!

Wurde der Reaktionsansatz 1 Stunde bei 80° C erhitzt, genügt nicht mehr die Mangan²⁺-Zugabe, um die Crocin-Bleichung auszulösen, sondern es muß Mn⁺ und POD zugegeben werden.

1.3.8. Ersatz für IAA und Peroxidase

Es wurde zum einen versucht, Indol-3-Essigsäure durch die Aminosäure Tryptophan, zum anderen Peroxidase durch Ascorbat-Oxidase zu ersetzen:

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 5,7	100 mM	POD	10 U
AO	20 U	IAA	0,5 mM
Try	0,5 mM	Mn ⁺	50 µM
pHAP	0,5 mM	Crocin	10 µM

Weder beim Ansatz, in dem IAA durch Tryptophan ersetzt wurde, noch bei POD-Ersatz durch Ascorbat-Oxidase, war innerhalb von 30 Minuten Crocin-Bleichung zu erkennen.

Auch der Verstärker p-Hydroxyacetophenon brachte keinen Abbau des Pigments; ebensowenig wurde durch Mangan²⁺ die Reaktion ermöglicht.

Auch war es nicht möglich, durch verschiedene Cytokinine (sowie Adenin und Adenosin) und Peroxidase Crocin abzubauen. Auch der Verstärker pHAP und Mangan²⁺ konnten zu keinem Abbau führen.

eingesetzte CYTOKININE (0,5 mM)

Kinetin

6 - Benzylaminopurin

6 - BAP-Ribosid

6 - Dimethylallylaminopurin

6 - DMAP-Ribosid

1.4. Ethan-Bildung aus α-Linolensäure

Die Fragmentierung von α-Linolensäure durch reaktive Sauerstoffspezies unter Freisetzung von Ethan deutet auf starke Oxidantien hin.

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,		POD	10 U
pH = 5,7	100 mM	Mn ⁺	50 µM
IAA	0,5 mM	HSO ₃ ⁻	0,5 mM
pHAP	0,5 mM		
Linolensäure		0,9 mM	

Selbst die sehr hohe Konzentration an α-Linolensäure in Detergenz emulgiert, ergab nach 1 Stunde Reaktionszeit und pHAP bzw. HSO₃⁻ als Verstärker im Gesamtansatz keine meßbare Ethan-Bildung. Auch die Änderung des pH-Wertes auf 7,8 brachte keine Ethanfreisetzung.

1.5. Nachweis von Peroxide

Im folgenden wurde untersucht, ob die Peroxidase während der Reaktion mit Indol-3-Essigsäure das eigentliche Substrat, H_2O_2 , selbst produziert.

Als H_2O_2 -Nachweis wurde der PAB-Test gewählt (siehe M+M).

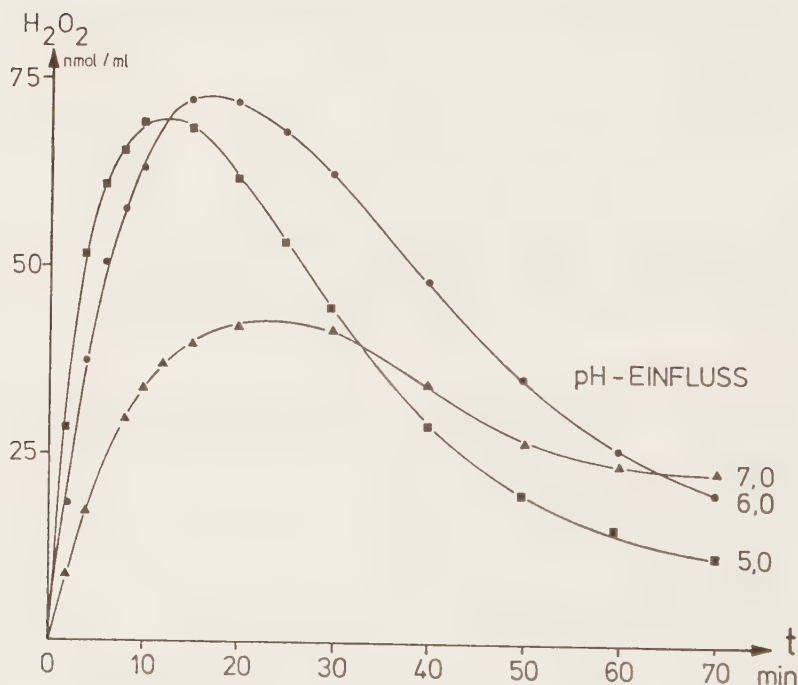


Abb. 69: pH-Einfluß auf Peroxidbildung durch POD - IAA

Reaktionsansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 5,0/6,0/7,0	100 mM
POD	10 U
IAA	0,5 mM
H ₂ O	ad 2 ml

H₂O₂-Nachweis (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 5,7	50 mM
POD	10 U
4-AA	2 mM
HDBS	7 mM
Reaktionsansatz	200 µl
Reaktionszeit	30 min.

Die vom Reaktionsansatz in den H_2O_2 -Nachweis herübergeschleppte IAA hat auf die Farbbildung keinen Einfluß; die IAA-Oxidation ist im Farbreagenz abgestoppt. Während der ersten 15 Minuten wird beim IAA-Abbau Peroxid gebildet, das anschließend rasch wieder verschwindet. Ausmaß und Zeitpunkt sind deutlich pH-abhängig. Bei gleichem pH-Wert und Variation der Enzymkonzentration wird mit steigender Aktivität die Zeit der Maximumausbildung verkürzt; die Höhe bleibt erhalten. Erhöhung der Substratkonzentration führt zu einer Erhöhung der Peroxidkonzentration, allerdings bei späterem Erreichen des Maximums.

1.6. ACC-Spaltung durch peroxidatischen Abbau

1.6.1. IAA-Abbau durch POD

1.6.1.1. Vergleich der Ethylenfreisetzung aus KMB - ACC - MET durch POD - Mn^{2+} - IAA

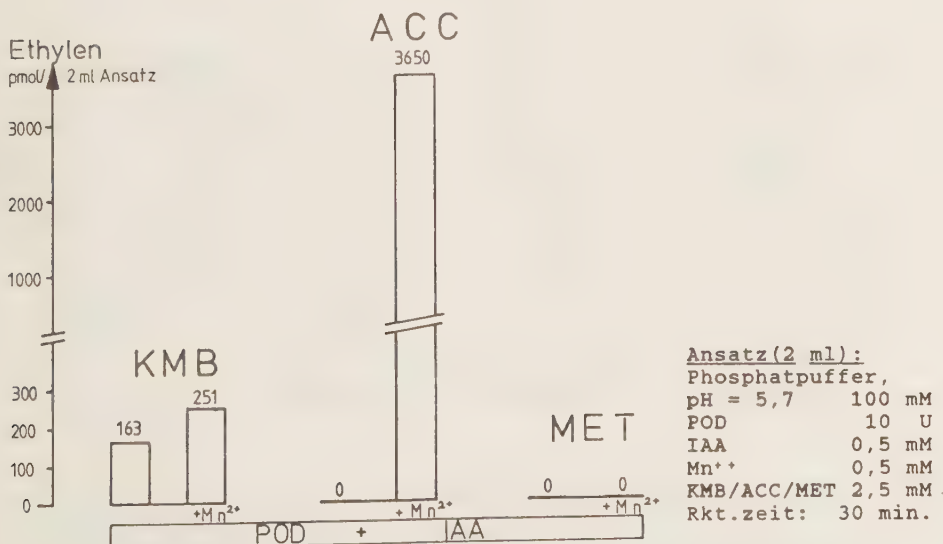


Abb.70: POD-IAA $\pm$ Mn^{2+} gegenüber den drei Indikatormolekülen

Methionin wird weder durch das System Peroxidase-Indoleessigsäure noch durch POD-IAA $\pm$ Mn^{++} fragmentiert.

Acc-Spaltung ist nur im Mn^{++} -Anwesenheit möglich; dann allerdings in deutlicher Reaktion.

1.6.1.2.1. pHAP-Stimulierung

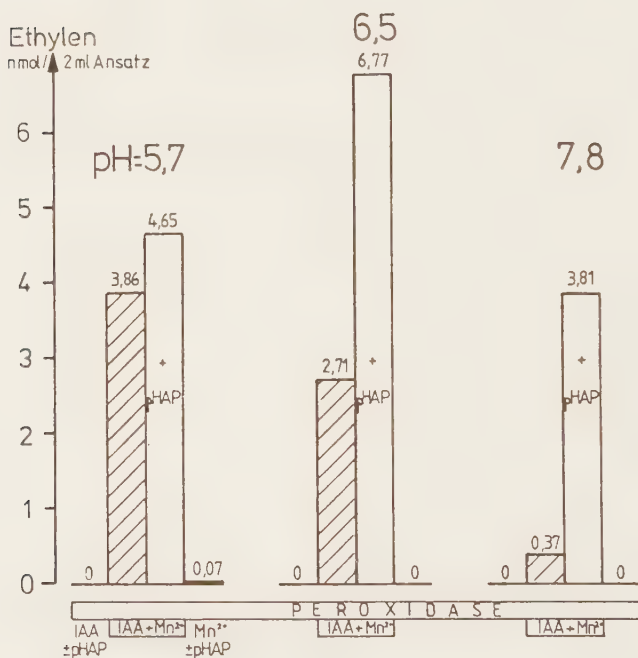


Abb.71: pH-Einfluß auf ACC-Spaltung

1.6.1.2.2. Einfluß der Mangan-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten

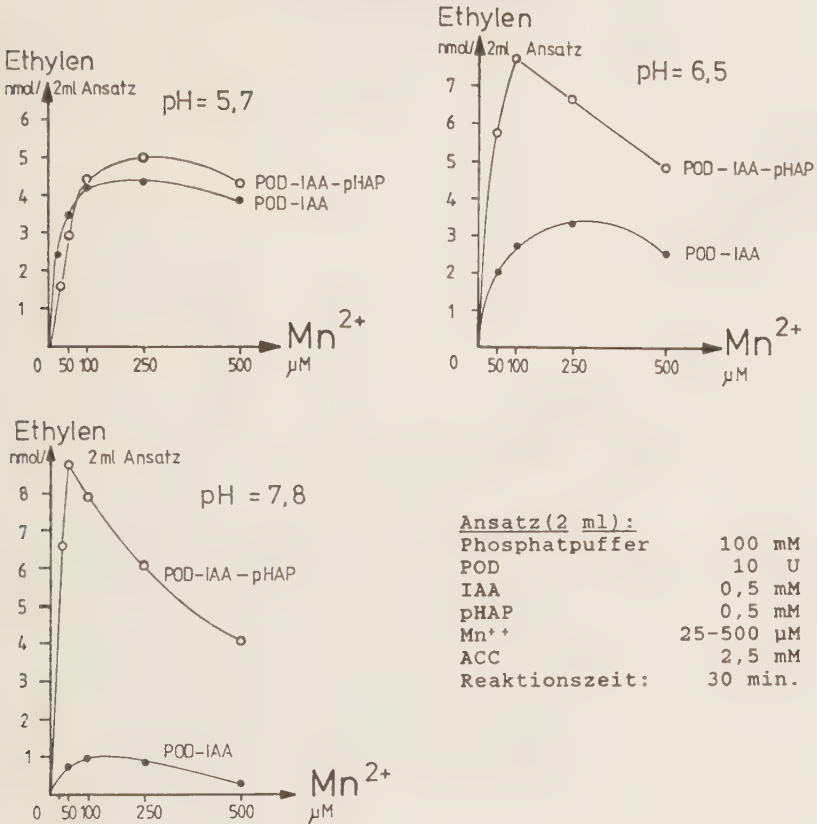


Abb.72: Einfluß der Mangan-Konzentration bei verschiedenen pH-Werten

Bei tiefstem pH-Wert (5,7) ist die Grundreaktion POD-IAA-Mn⁺⁺ am höchsten, die pHAP-Stimulation minimal, die Reaktion im oberen Bereich unabhängig von der Mangan-Konzentration. Mit zunehmend basischem pH-Wert sinkt die Ethylenfreisetzung aus ACC, die Stimulierung durch pHAP wird deutlicher; die Reaktion zeigt ein zunehmend schärfer ausgeprägtes Konzentrationsoptimum von Mangan, das sich dazu noch zu geringerer Konzentration verschiebt.

1.6.1.3. Grundreaktion Peroxidase - Mangan²⁺

pHAP-Stimulierung

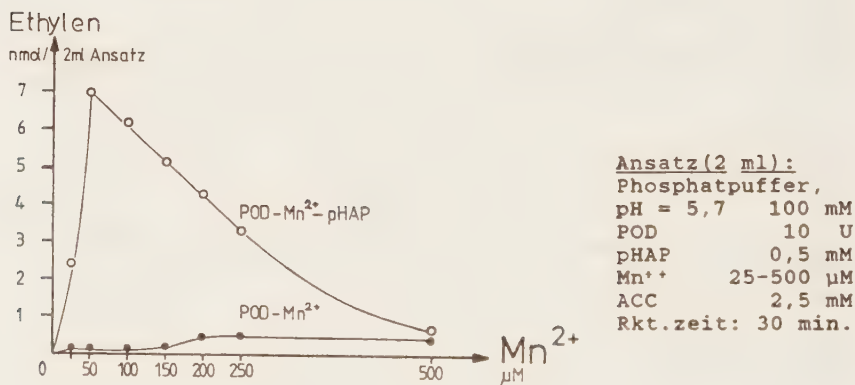


Abb.73: Mn²⁺-Einfluß auf die pHAP-stimulierte POD-Mn²⁺-Reaktion

Die Grundreaktion POD-Mangan²⁺ (ohne IAA) spaltet nur minimal ACC.

Die sehr deutliche Stimulierung durch pHAP tritt bei 50 μM Mangan²⁺ auf.

Steigende Konzentration an Mn²⁺ hebt die Stimulation durch pHAP auf.

1.6.1.4. Konzentrationseinflüsse von IAA und pHAP

1.6.1.4.1. Einfluß der IAA-Konzentration

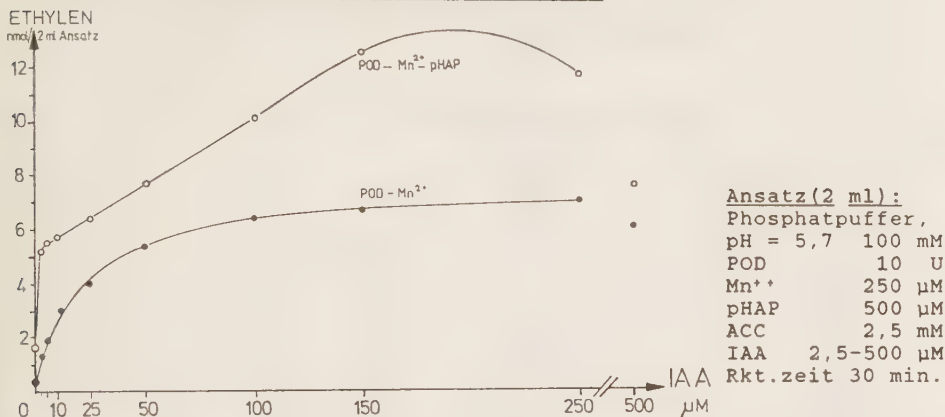


Abb.74: Einfluß von IAA auf die ACC-Spaltung durch POD-Mn²⁺ ± pHAP

Die deutlichste IAA-Stimulierung erfordert den pH = 5,7 sowie eine optimale Mn²⁺-Konzentration von 250 µM.

Steigende IAA-Konzentration im System POD-Mn²⁺ ergibt den typischen Verlauf einer Sättigungskurve. Das System POD-Mn²⁺ - pHAP zeigt dagegen über einen weiten IAA-Konzentrationsbereich (5-150 µM) eine exakt lineare Abhängigkeit. Steigerung über das Optimum hinaus führt zu einer deutlichen Ethylenabnahme gegenüber der nicht phenolisch katalysierten Reaktion.

1.6.1.4.2. Einfluß der pHAP-Konzentration

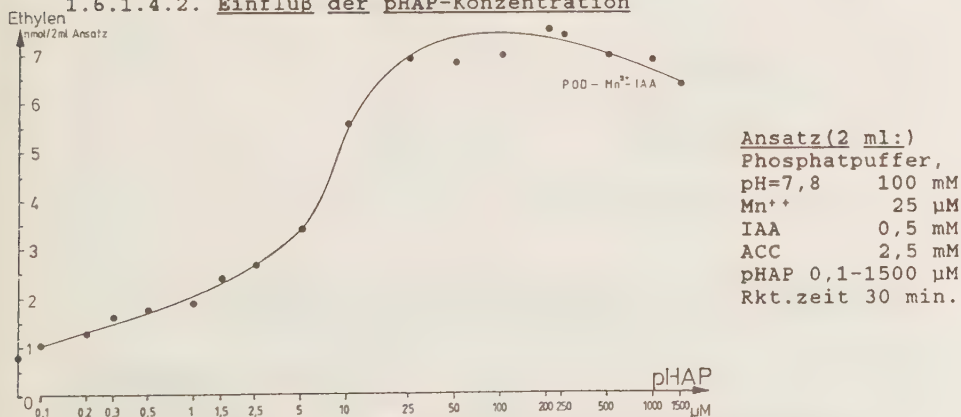


Abb.75: pHAP-Einfluß auf die ACC-Spaltung durch POD-Mn²⁺-IAA

Am auffallendsten zeigt sich die pHAP-Stimulation bei pH=7,8 und sehr geringen Mn^{++} -Konzentrationen (25 μM); über den sehr weiten Bereich von 0,1 - 5 μM pHAP ergibt sich eine langsame Zunahme der Ethylenbildung. Im Bereich um 10 μM erfolgt eine sehr rasche Steigerung, die ab 25 μM Sättigung erreicht.

1.6.1.5. Vergleich der Stimulation durch pHAP und HSO_3^- im System POD- Mn^{++} -IAA

1.6.1.5.1. Grundsystem POD- Mn^{++}

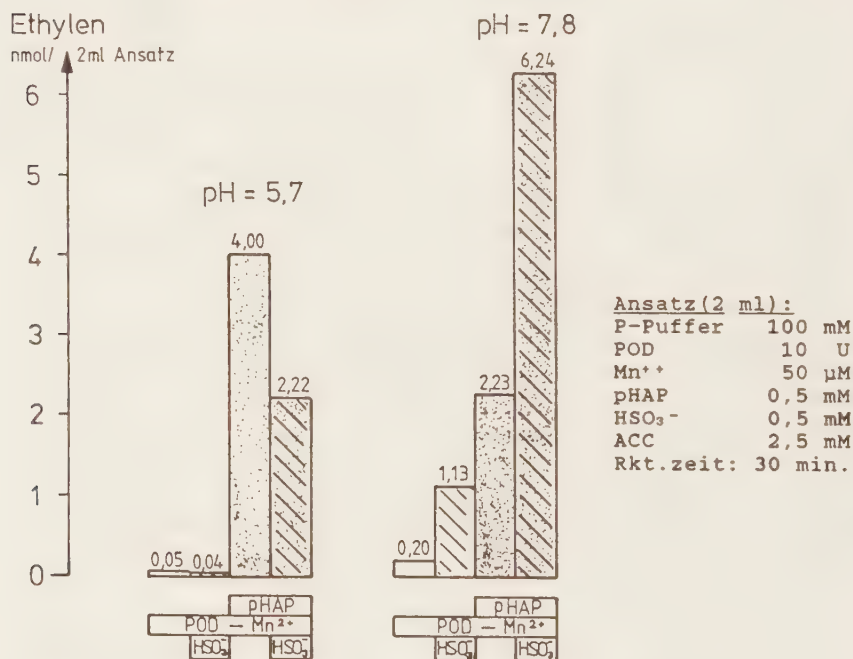


Abb.76: Verstärker pHAP und HSO_3^- im POD- Mn^{++} -System

Die Grundreaktion POD- Mn^{++} spaltet in sehr geringem Maße ACC im sauren Bereich; die Reaktion wird nicht HSO_3^- -stimuliert. Die deutliche 'pHAP-Stimulation wird durch Sulfit um 45 % gehemmt.

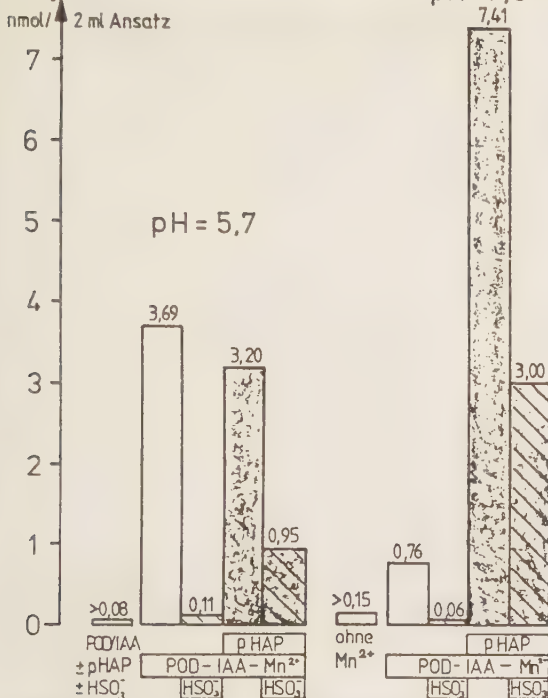
Im schwach alkalischen Milieu ist der Grundethylenbetrag etwas höher, er wird durch HSO_3^- deutlich (5-fach) stimuliert; pHAP erhöht um den Faktor 11. HSO_3^- und pHAP zeigen einen überadditiven Effekt um das 31-fache!

1.6.1.5. Indolessigsäure - POD-Mn²⁺-System

Ethylen

nmol/l 2 ml Ansatz

pH=7,8



Ansatz (2 ml):

P-Puffer	100 mM
POD	10 U
Mn ²⁺	50 µM
IAA	0,5 mM
pHAP	0,5 mM
HSO ₃ ⁻	0,5 mM
ACC	2,5 mM
Rkt.zeit:	30 min.

Abb.77: Verstärker pHAP und HSO₃⁻ im POD-Mn²⁺-IAA-System

Die Zugabe von Indolessigsäure zum POD-Mn²⁺-Grundsystem führt im Säuren zu einer wesentlich deutlicheren Ethylenfreisetzung als im alkalischen Milieu.

Die POD-IAA-Mn²⁺-Reaktion wird durch HSO₃⁻ im Säuren wie Basischen auf den Nullwert gehemmt. Bei pH = 5,7 führt pHAP zu keiner Stimulierung, durch die weitere Zugabe von HSO₃⁻ wird die Reaktion auf 30 % gehemmt, aber nicht auf "Null", wie in der Reaktion ohne Phenol.

Bei pH = 7,8 wird die Reaktion durch pHAP um den Faktor 9,8 stimuliert, durch HSO₃⁻ wird diese stimulierte Reaktion auf 40 % gehemmt (ebenfalls nicht auf Null).

1.6.1.6. Einfluß von Picein auf die Reaktion POD-Mn²⁺-IAA bei verschiedenen Inkubationszeiten mit Cellulase

Vergleich: Picein - pHAP

Vorinkubationsansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 5,7	100 mM	Picein	10 mM
Cellulase	10 U	Temperatur:	37° C

ACC-Spaltung:

Phosphatpuffer, pH = 7,8

Mn²⁺

ACC

Picein

100 mM

25 μ M

0,5 mM

0,5 mM

POD 10 U

IAA 0,5 mM

pHAP 0,5 mM

Rkt.zeit: 30 min.

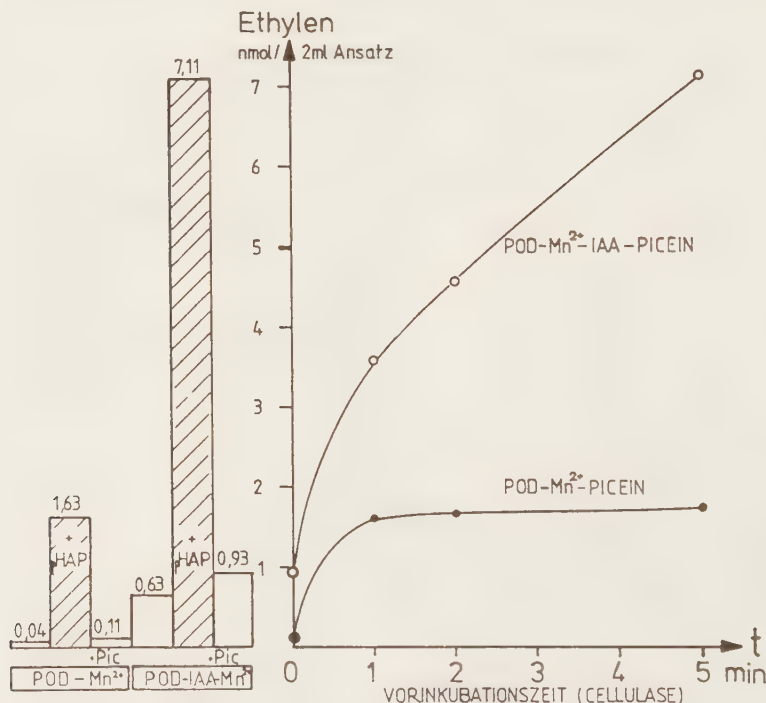


Abb. 78: Einfluß der Cellulase-Aktivität auf die Verstärkung durch Picein

Der geringe Grundwert durch POD-Mn²⁺ wird durch Picein nur geringfügig erhöht, was auf Reste an freiem Aglucon zurückzuführen sein dürfte. Bereits nach 1 Minute Vorinkubation von Picein mit Cellulase ist die durch pHAP bedingte Stimulation erreicht.

In der Reaktion POD-Mn²⁺-IAA erfolgt die durch entsprechende pHAP-Konzentration erreichte Stimulation über längere Cellulasewirkung.

Auch hier dürfte die leichte Erhöhung des Grundwertes durch Picein auf freies pHAP zurückzuführen sein.

1.6.1.7. Hemmstoff-Einfluß

1.6.1.7.1. Einfluß von SOD und KAT

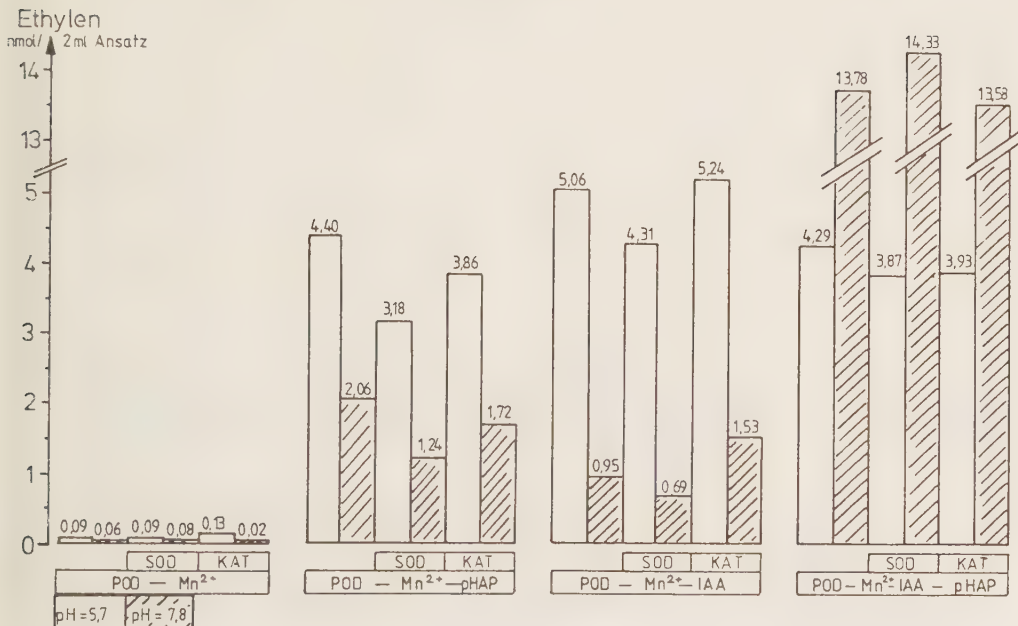


Abb.79: Hemmstoffe SOD und KAT im System POD-Mn²⁺/± pHAP/± IAA

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer	100 mM	POD	10 U
Mn ²⁺	50 µM	IAA	0,5 mM
pHAP	0,5 mM	SOD	100 U
KAT	100 U	ACC	2,5 mM
Reaktionszeit:		30 min.	

SOD und KAT zeigen auf die geringe Ethylen-Bildung durch POD-Mn²⁺ keinen Einfluß.

Die durch weitere Zugabe von pHAP erreichte Stimulierung wird durch SOD bei pH = 5,7 um 28 %, bei pH = 7,8 um 40 % gehemmt. KAT hemmt dagegen nur um 12 % bzw. 16 %.

In der Reaktion POD-Mn²⁺-IAA ist der Einfluß von SOD geringer: 15 % bei pH = 5,7, 23 % bei pH = 7,8.

KAT zeigt keine Hemmung.

Die Reaktion POD-Mn²⁺-IAA-pHAP wird weder durch SOD noch durch KAT gehemmt.

1.6.1.7.2. Einfluß der Radikalfänger Formiat-Mannit

Ethylen
nmol/2 ml Ansatz

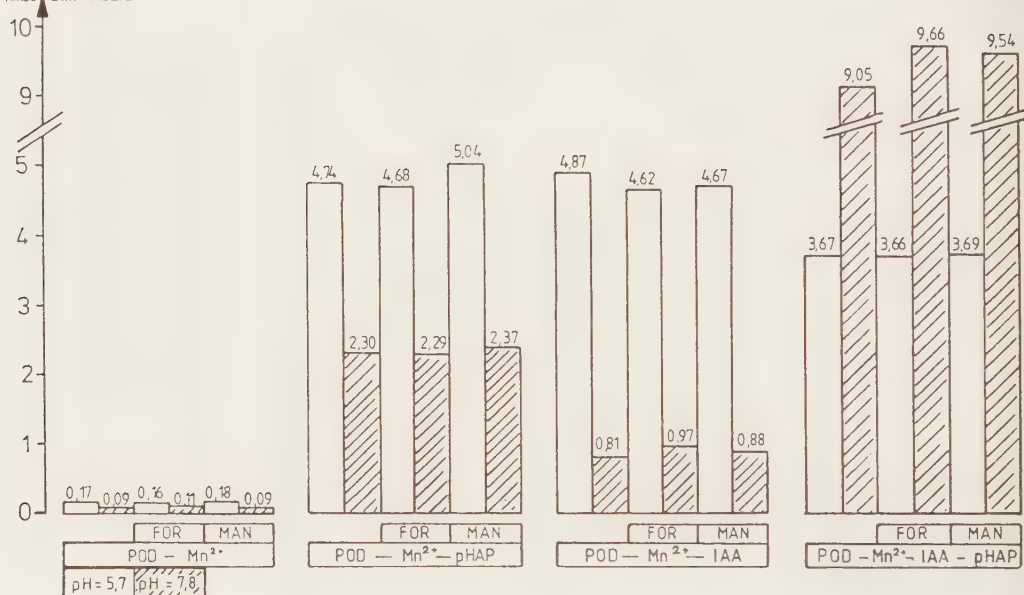


Abb.80: Hemmstoffe Formiat und Mannit im System POD-Mn²⁺/± F/± M

Ansatz/2 ml:

Phosphatpuffer	100 mM	POD	10 U
Mn ²⁺	50 µM	IAA	0,5 mM
pHAP	0,5 mM	Formiat	0,5 mM
Mannit	0,5 mM	ACC	2,5 mM

Reaktionszeit: 30 min.

Formiat und Mannit beeinflussen keinen der vier Reaktionstypen.

1.6.1.7.3. Einfluß von Ascorbinsäure und Propylgallat

<u>Ansatz/2 ml:</u>	Phosphatpuffer	100 mM	POD	10 U
	Mn ²⁺	50 µM	IAA	0,5 mM
	pHAP	0,5 mM	ACC	2,5 mM
	Asc	0,5 mM	PG	0,5 mM

Reaktionszeit: 30 min.

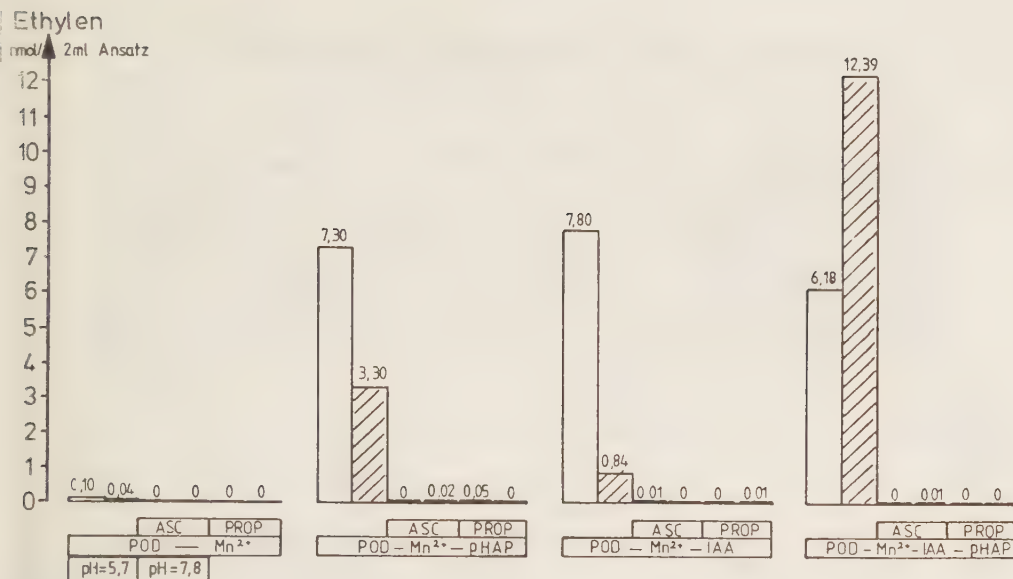


Abb.81: Hemmstoffe Ascorbat und Propylgallat im System POD-Mn²⁺/± Asc/± Prop

Ascorbat und Propylgallat hemmen die Reaktionen völlig.

1.6.1.8. Vergleich : KMB - ACC - Fragmentierung

Reaktion : POD-IAA-Mn²⁺

Stimulation: HSO₃⁻-pHAP

Bedingung : pH = 5,7 - 7,8

ACC-Spaltung:

Ohne Mangan²⁺ erfolgt keine ACC-Spaltung.

Im System POD - Mn²⁺ erfolgt geringe HSO₃⁻-Stimulierung bei pH = 5,7, eine deutliche bei pH = 7,8.

pHAP wirkt nur im sauren Bereich als Verstärker.

Anmerkung: Die höhere Mangankonzentration (gegenüber B.1.6.1.5.) führt zu deutlich höheren Werten beim Sulfit, zu niedrigeren Werten bei pHAP!

Bei pH=5,7 erfolgt eine additive Stimulation durch pHAP+ HSO₃⁻, im alkalischen Bereich ein synergistischer Effekt:

" 4,4 + 0,09 = 18,6 nmol "

Die deutliche Reaktion POD-IAA-Mn²⁺ wird durch HSO₃⁻ auf 22 %

(pH = 5,7) bzw. 17 % (pH = 7,8) gehemmt; ebenso wird die Phenol-verstärkte Reaktion auf 48 % bzw. 67 % abgesenkt.

KMB-Spaltung:

Eine KMB-Spaltung erfolgt nicht ohne HSO_3^- .

In keinem der drei Systeme erfolgt Ethylenbildung nach pHAP-Zugabe.

Das System POD-IAA zeigt nur im sauren Bereich bei HSO_3^- -Zugabe eine deutliche Reaktion; pHAP führt zu keiner Stimulation. Dagegen setzt POD-Mn^{2+} nach HSO_3^- -Zugabe nur bei pH = 7,8 Ethylen frei; durch pHAP wird die Reaktion im Sauren verstärkt, bei pH = 7,8 sehr viel Ethylen gebildet.

Die Reaktion $\text{POD-IAA-Mn}^{2+} + \text{HSO}_3^-$ wird durch pHAP um 44 % bei pH = 5,7 bzw. 75 % bei pH = 7,8 verstärkt.

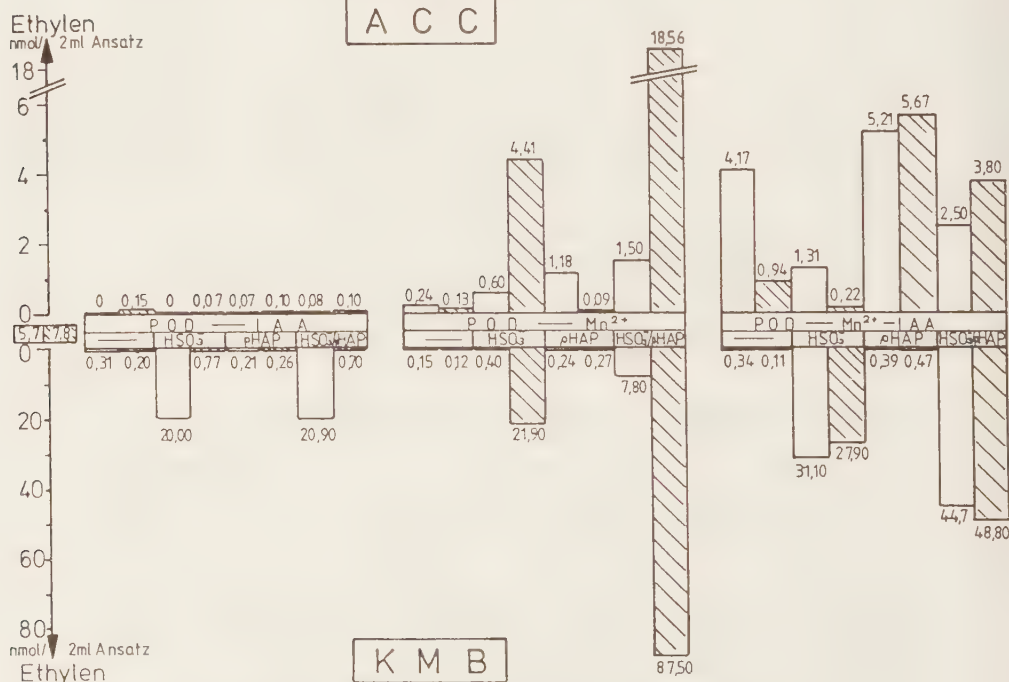


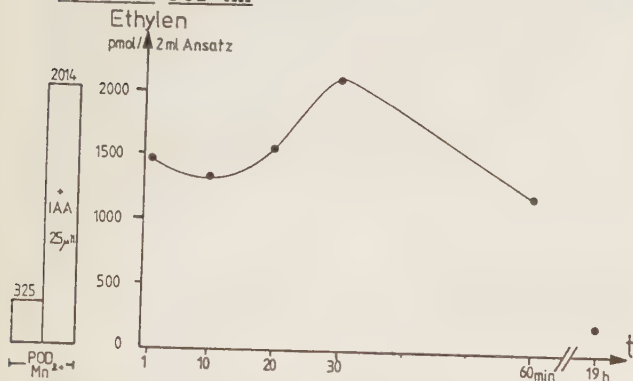
Abb.82: Vergleich der KMB- mit ACC-Spaltung durch $\text{POD-Mn}^{2+} \pm \text{IAA}$ und $\text{pHAP}/\text{HSO}_3^-$ als Verstärker

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer	100 mM	POD	10 U	pHAP	0,5 mM
HSO_3^-	0,5 mM	IAA	0,5 mM	Mn^{2+}	250 μM
ACC	2,5 mM	KMB	2,5 mM	Rkt.zeit:	30 min.

1.6.2. Einfluß der IAA-Abbauprodukte durch POD auf die ACC-Spaltung durch POD-Mn⁺⁺ ± pHAP

System: POD-Mn⁺⁺



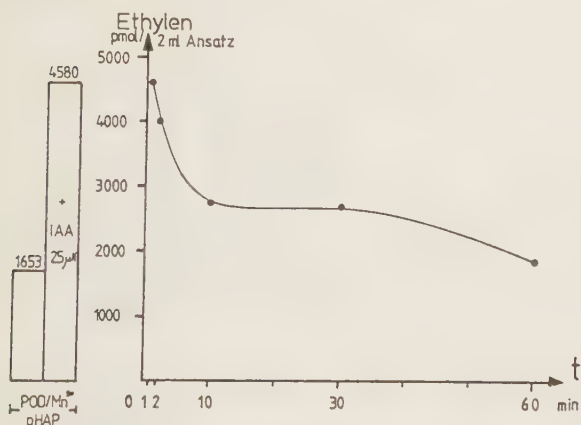
Reaktionsansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,
pH = 5,7 100 mM
POD 10 U
IAA 0,5 mM
Temperatur: 25° C
100 µl = 25 µM

t = 1-19 Std.

Abb. 83: IAA-Abbauprodukte im System POD-Mn⁺⁺

System: POD-Mn⁺⁺-pHAP



Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,
pH = 5,7 100 mM
Mn⁺⁺ 250 µM
±pHAP 0,5 mM
IAA maximal 25 µM

Abb. 84: IAA-Abbauprodukte im System POD-Mn⁺⁺-pHAP

Unter 2. wurde bereits gezeigt, daß POD allein in der Lage ist, IAA abzubauen.

Zu verschiedenen Zeiten wurden aus diesem Reaktionsansatz jeweils 100 µl entnommen und anschließend die Stimulation der

POD-Mn²⁺ - bzw. POD-Mn²⁺-pHAP -verursachten ACC-Spaltung durch diese IAA + Produkt-Mischung verglichen.

Die Mischung erreicht in ihrer stimulierenden Wirkung erst nach 30 Minuten Reaktionszeit ein Maximum (= Wirkung der entsprechenden IAA-Ausgangskonzentration) auf das System POD-Mn²⁺. Nach 1 Stunde Reaktion ist noch ein deutlicher Effekt erkennbar, obwohl keine IAA mehr in der Mischung vorliegt.

Nach 19 Stunden ist der POD-Mn²⁺-Nullwert erreicht.

In der durch pHAP erhöhten Grundreaktion bedarf der Ethylen-freisetzende Effekt stets einer längeren Reaktionszeit. Nach 1 Stunde ist die Reaktion auf den Grundwert abgesunken.

1.6.3. Einfluß der IAA-Abbauprodukte auf die ACC-Spaltung durch POD-Mn²⁺ ± pHAP

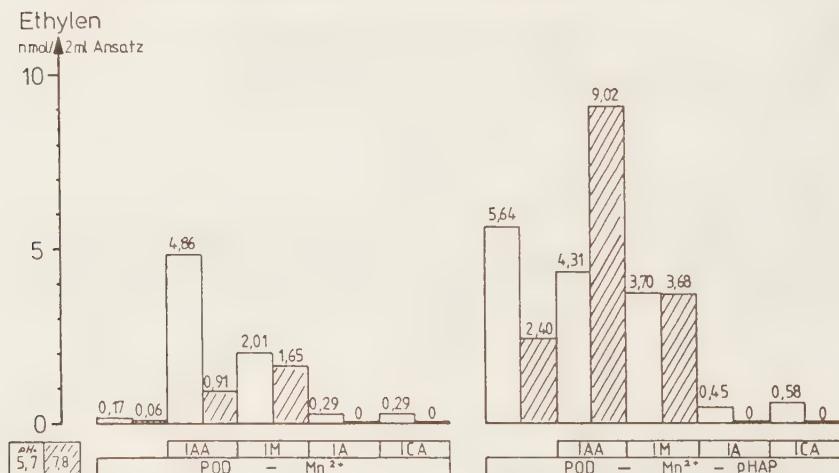


Abb.85: ACC-Spaltung durch IAA und seine Abbauprodukte im System POD-Mn²⁺ ± pHAP

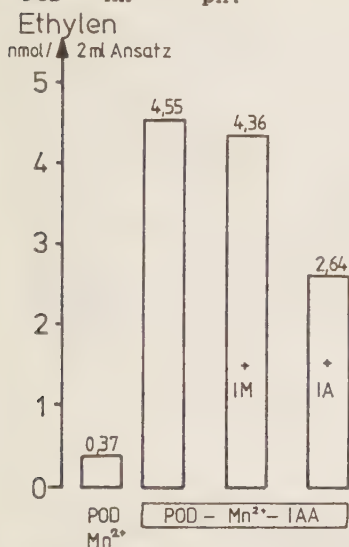
<u>Ansatz (2 ml):</u>	Phosphatpuffer, pH = 5,7/7,8	100 mM
	POD	10 U
	IAA	0,5 mM
	Mn ²⁺	50 µM
	pHAP	0,5 mM
	IA	0,5 mM
	IM	0,5 mM
	ICA	0,5 mM
	ACC	2,5 mM
	Reaktionszeit:	30 min.

Im Grundsystem POD-Mn²⁺ zeigt IAA eine deutliche Stimulation, im sauren Bereich eine erheblich höhere.

Das Hauptprodukt IM wirkt ebenfalls stimulierend, allerdings nur zu 40 % vom IAA-Wert und zeigt keine Abhängigkeit vom pH-Wert. Indol-3-Aldehyd und Indol-3-Carbonsäure sind nicht in der Lage, mit POD-Mn²⁺ ACC zu fragmentieren.

Die durch den Verstärker PHAP erhöhte Ethylenbildung wird durch IAA nur im alkalischen Bereich nochmals stimuliert. IM zeigt unabhängig von dem pH-Wert keine deutliche Erhöhung.

IA und ICA hemmen die Ethylenfreisetzung aus ACC durch POD - Mn²⁺ - pH:



Das aus dem peroxidatischen Abbau entstehende Hauptprodukt IM zeigt keinen deutlichen Effekt auf die IAA-stimulierte Ethylenfreisetzung.

Das zweithäufigste Produkt IA dagegen hemmt diese Reaktion um 40 %.

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 5,7	100 mM
POD	10 U
Mn ²⁺	250 µM
IAA	0,5 mM
IM	0,5 mM
IA	0,5 mM
ACC	2,5 mM
Reaktionszeit:	30 min.

Abb.86: Einfluß von IA und IM auf die ACC-Spaltung durch POD-Mn²⁺-IAA

1.6.4. Vergleich: Peroxidase mit Ascorbat-Oxidase (AO)

POD / AO	p mol Ethylen/2 ml Ansatz	
	POD	AO
+ Mn ²⁺	219	85
+ Mn ²⁺ + IAA	4091	47
+ Mn ²⁺ + IAA + pHAP	5277	80

Tab.34: POD- und AO-Katalyse der Ethylenbildung aus ACC

Die in Chloroplasten existierende Ascorbat-Oxidase ist nicht in der Lage, analog der POD, IAA in Anwesenheit von Mn^{++} abzubauen und dabei aus ACC Ethylen freizusetzen. Auch die Zugabe des Substrates Ascorbat ergab nur Werte im Bereich < 100 p mol.

1.6.5. Tryptophan - Wirkung auf die ACC-Spaltung im System POD-Mn⁺⁺



Abb.87: Tryptophan-Einfluß im POD-Mn⁺⁺-System

Ein Vergleich mit IAA zeigt bei Tryptophan eine um ca. 50 % geringere, dennoch deutliche Stimulation der POD-Mn⁺⁺-Reaktion.

Im Gegensatz zu IAA zeigt pHAP mit Tryptophan keinen Einfluß auf die Reaktion. Die Reaktion POD-IAA-Mn⁺⁺ wird durch Try-Zugabe geringfügig gehemmt.

2. Cystein-Abbau

2.1. Messung des Sauerstoff-Verbrauchs in der Sauerstoff-Elektrode

2.1.1. pH-Einfluß

System	nmol O ₂ /min/2 ml	
	pH = 5,7	pH = 7,8
POD + CYS	2	2
POD + CYS + pHAP	12	39

Tab.35: pH-Einfluß auf O₂-Zehrung

Bedingungen:

2 ml Reaktionsvolumen, 25° C = 506 nmol O₂ bei Sättigung
 Phosphatpuffer 100 mM POD 10 U
 CYS 0,5 mM pHAP 0,5 mM

Die Sauerstoffaufnahme wurde während den ersten drei Minuten gemessen, da die Rate rasch abflachte.
 Bei pH = 7,8 war die Sauerstoff-Zehrung wesentlich deutlicher. Ohne pHAP konnte nur ein minimaler Grundwert gemessen werden; pHAP ist also für eine peroxidative O₂-Aufnahme notwendig.

2.1.2. Konzentrationseinflüsse

System		nmol O ₂ /min/2 ml	
		pH = 5,7	pH = 7,8
POD - pHAP - CYS	0,5 mM	12	39
	1,0 mM	19	65
	2,5 mM	57	130

POD-Konzentration		nmol O ₂ /min/2 ml	
		pH = 5,7	pH = 7,8
System: CYS - pHAP - POD	5 U	10	
	10 U	12	
	20 U	6	
(pH = 5,7)			

pHAP-Einfluß		nmol O ₂ /min./2 ml	
		pH = 5,7	pH = 7,8
System: CYS - POD - pHAP	0,5 mM	12	
	1,0 mM	9	
	1,5 mM	6	
(pH = 5,7)			

Tab.36: CYS-, POD- und pHAP-Einfluß auf O₂-Zehrung

Bedingungen:

2 ml Ansatz, 25° C = bei O₂-Sättigung 506 nmol O₂
Phosphatpuffer 100 mM POD 10 U
CYS 0,5 mM pHAP 0,5 mM

Das O₂-zehrende POD-CYS-pHAP-System zeigt einen direkten Einfluß von der Cystein-Konzentration der bei pH = 7,8 deutlicher ausgeprägt ist.

POD zeigt keinen Konzentrationseinfluß. Die pHAP-Konzentration dürfte bereits im Sättigungsbereich vorliegen.

2.1.3. Einfluß von Crocin

System	nmol O ₂ /min./2 ml
POD - CYS	2
POD - CYS - Crocin	4
POD - CYS - pHAP	39
POD - CYS - pHAP - Crocin	2

Tab.37: Crocin-Einfluß auf O₂-Verbrauch

Auf die Grundreaktion wirkt Crocin stimulierend (allerdings im unteren Bereich); dagegen hemmt Crocin die eigentlich O₂-zehrende Reaktion POD - CYS - pHAP fast völlig.

2.1.4. Einfluß von NH₂OH

System	nmol O ₂ /min./2 ml
POD - CYS + NH ₂ OH	0
POD - CYS - pHAP + NH ₂ OH	2

Tab.38: Hydroxylamin-Einfluß auf O₂-Verbrauch

Das durch O₂ leicht oxidierbare NH₂OH wirkt als guter Hemmstoff des peroxidatischen CYS-Abbaus.

Ansätze(2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM POD 10 U
CYS 0,5 mM pHAP 0,5 mM
NH₂OH 0,5 mM Crocin 10 µM

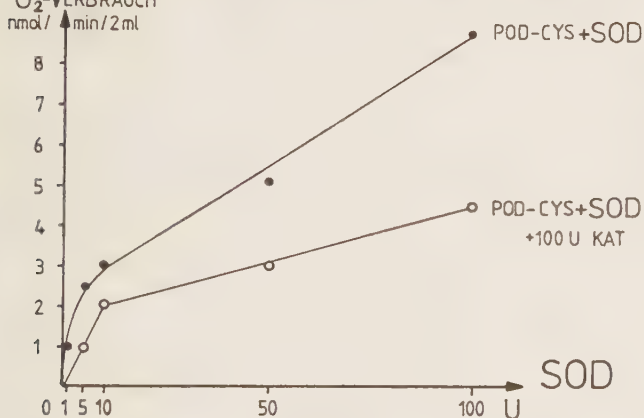
2.1.5. SOD-Einfluß

2.1.5.1. Einfluß auf die Reaktion POD-CYSTEIN

In jeweils verschiedenen Ansätzen wurden nach CYS und POD unterschiedliche SOD-Konzentrationen, anschließend stets 100 U Katalase zugegeben.

System	n mol O ₂ / min .2 ml	+ 100 U KAT	= % - Hemmung
CYS + POD —————	0.5	0	—
↓			
+ 1 U SOD	1.0	0	—
5 U SOD	2.5	1.0	60
10 U SOD	3.0	2.0	33
50 U SOD	5.1	3.0	41
↓			
100 U SOD	8.8	4.5	49

O₂-VERBRAUCH
nmol/ min/2ml



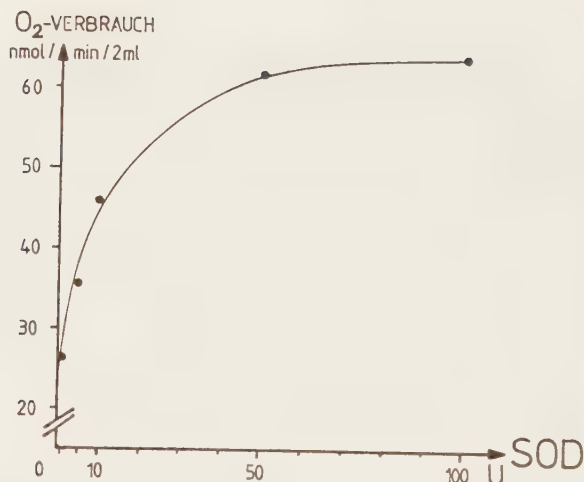
Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 5,7 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,5 mM
 SOD 1-100 U
 KAT 100 U

Tab.39/Abb.88: O₂-Zehrung in Abhängigkeit der SOD-Konzentration

Die minimale O₂-Zehrung durch POD-CYS wird durch steigende Konzentration SOD deutlich stimuliert. Die durch anschließende KAT-Zugabe halbierte O₂-Rate deutet H₂O₂-Entstehung an.

2.1.5.2. SOD-Einfluß auf die Reaktion POD-CYS-pHAP

	nmol O ₂ /min./2 ml
Grundreaktion: CYS-POD-pHAP —————	35,9
SOD-Stimulation: ↓ ↓ ↓	
+ 1 U SOD	26,3
+ 5 U	35,4
+ 10 U	46,0
+ 50 U	61,7
+100 U	63,3



Ansatz (2 ml):
 25°C = 506 nmol
 O₂/min./2 ml
 Phosphatpuffer,
 pH = 7,8 100 mM
 CYS 10 U
 pHAP 0,5 mM
 SOD 1-100 U
 POD 10 U

Tab.40/Abb.89: SOD-Einfluß auf O₂-Verbrauch im System POD-CYS-pHAP

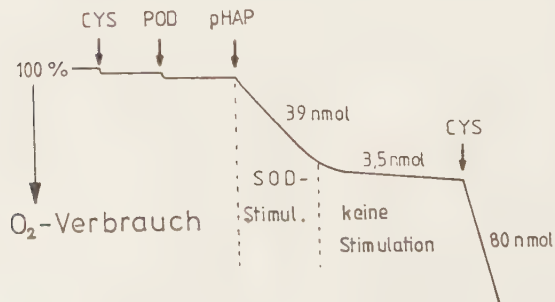
Erst ab 10 U SOD kann eine deutliche Stimulierung der Reaktion festgestellt werden. Die Konzentrationsreihe zeigt den Verlauf einer Sättigungskurve.

2.1.5.3. Bedingungen für die SOD-Stimulation

Bei pH = 5,7 erfolgt keine SOD-Stimulation

SOD-Hemmung:	
System	nmol O ₂ /min./2 ml
CYS - POD - pHAP	12,0
CYS - POD - pHAP + SOD	2,5

Tab.41: SOD-Effekt bei pH = 5,7



Die SOD-Stimulation erfolgt nur während der Initial-Rate. Cystein wird während der Reaktion verbraucht, so daß im flachen Verlauf keine Stimulation mehr möglich ist.

Einfluß von RSA

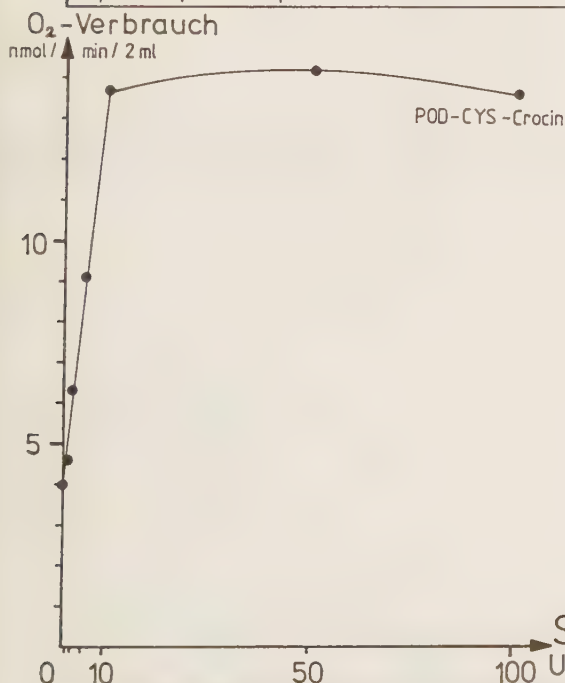
Zur Vergewisserung, daß es sich beim SOD-Effekt nicht um einen Protein-Effekt handelt, wurde die 100 U SOD entsprechende Protein-Konzentration an RSA eingesetzt:

	nmol O ₂ /min./2 ml
CYS - POD	2
CYS - POD - RSA (50 µg)	2

2.1.6. SOD-Effekt auf Crocin-beeinflußte Reaktion

2.1.6.1. System: POD - CYSTEIN + Crocin

	nmol O ₂ /min./2 ml
POD - CYS	2
POD - CYS - Crocin	4
POD - CYS - Crocin + 1 U SOD	4,6
2 U	6,3
5 U	9,1
10 U	13,7
50 U	14,2
100 U	13,7



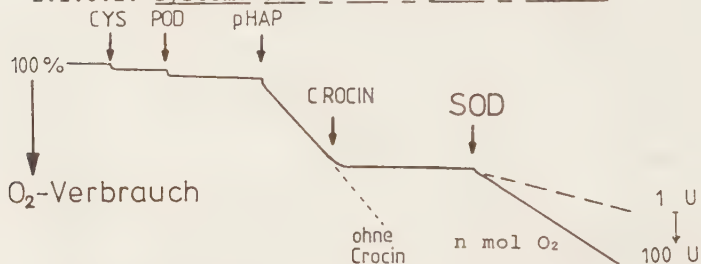
Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,
pH = 7,8 100 mM
POD 10 U
CYS 0,5 mM
Crocin 10 µM
SOD 1-100 U

Tab.42/Abb.90: SOD-Einfluß im System POD-CYS + Crocin

Es erfolgt durch SOD eine deutliche Stimulierung der durch Crocin leicht angehobenen Grundrate. Bereits bei 10 U SOD ist eine Sättigung erreicht. Bis 10 U verläuft die SOD-Abhängigkeit linear.

2.1.6.2. System: POD - CYS - pHAP + Crocin

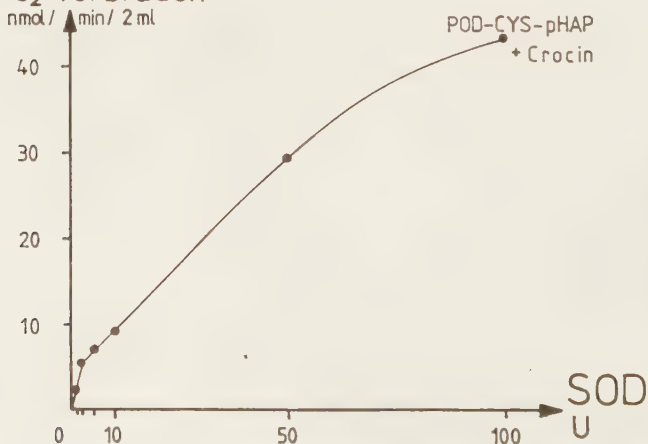


System	n mol O ₂ / min. 2 ml
CYS - POD - pHAP - Crocin	2.0
+ 1 U SOD	2.5
2 U SOD	5.6
5 U SOD	7.8
10 U SOD	8.6
50 U SOD	29.3
100 U SOD	43.0

Die durch pHAP verursachte deutliche O₂-Aufnahme wird durch Crocin auf den minimalen Grundwert abgesenkt, durch Zugabe steigender SOD-Enzymeinheiten wiederhergestellt.

Ein deutlicher Effekt zeigt sich bereits ab 2 U SOD.

O₂-Verbrauch



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 Crocin 10 µM
 SOD 1-100 U

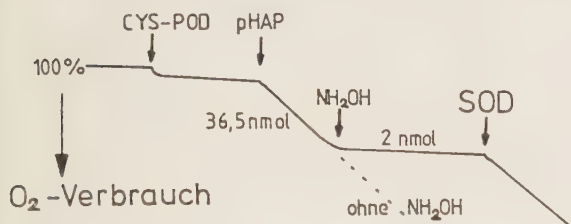
Tab.43/Abb.91: SOD-Einfluß im System POD-CYS-pHAP-Crocin

2.1.7. SOD-Einfluß auf die NH_2OH -gehemmte Reaktion

2.1.7.1. CYS-POD- NH_2OH -System

	n mol O_2 / min. 2 ml
CYS-POD	2
CYS-POD- NH_2OH	0
CYS-POD- NH_2OH -SOD (100 U)	0

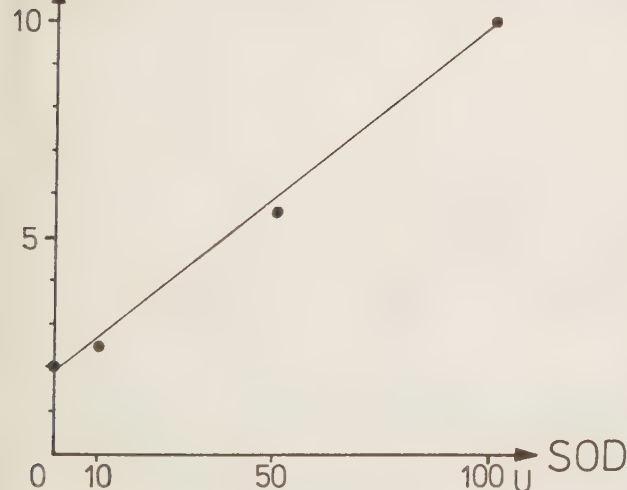
2.1.7.2. CYS-POD-pHAP- NH_2OH -System



	n mol O_2 / min. 2 ml
10 U SOD	2.5
50 U SOD	5.6
100 U SOD	10.1

O_2 -Verbrauch

nmol / min / 2 ml



Grundsätzlich verläuft die Reaktion analog der Crocin-gehemmten Sauerstoffaufnahme durch POD-CYS-pHAP. Allerdings zeigt sich erst ab 10 U SOD eine geringfügige Aufhebung der NH_2OH -Hemmung. Auch bei sinnvoller Maximalkonzentration von 100 U SOD wird die durch pHAP vermittelte O_2 Zehrung nicht annähernd wiederhergestellt.

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer, pH = 7.8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 NH_2OH 0,5 mM
 SOD 10 - 100 U

Tab.44/Abb.92: SOD-Einfluß im System POD-CYS-pHAP- NH_2OH

2.2.2. "Neuer" Ellman-Test

Die Peroxidase kann den aus der Disulfid-Spaltung entstandenen Ellman-Farbstoff abbauen.

Als POD-Denaturierung wurde ein in 90 %-igem MeOH ablaufendes Nachweisverfahren gewählt (Hitzedenaturierung schied wegen der relativen Instabilität von Cystein aus !).

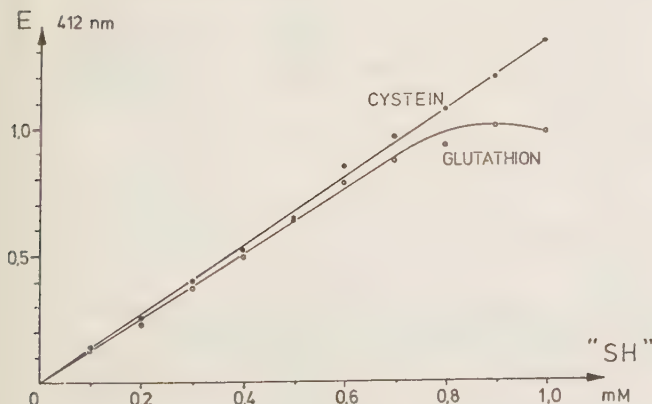
DTNB wurde 1 mM in 100 % MeOH angesetzt. 1 ml dieser Lösung wurde in 1 ml Glas-Küvetten vorgelegt und dazu 100 μ l des betreffenden Testansatzes zugegeben. Nach 30 Minuten Farbwentwicklung konnte zwar eine lineare Beziehung CYS-Konz./OD festgestellt werden, allerdings mit extrem geringen (10 mM CYS: $E_{412} = 0,26$) Extinktionen.

So wurde anstelle der 100 % MeOH, 98 % MeOH und 2 % 0,1 N NaOH (= 0,002 N NaOH) als DTNB-Lösungsmittel verwendet (Ellmann-Optimum bei ca. pH = 8,5).

Um den bei Zugabe von 100 μ l Reaktionsansatz ausfallenden Phosphatpuffer abzutrennen, wurde die 20 minütige Farbwentwicklung in 1 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt; anschließend wurde in einer Microzentrifuge bei 2000 U/min. (= 4500 g) 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig in 1 ml Glas-Küvetten überführt und anschließend bei 412 nm bestimmt.

Eichkurve: Cystein bzw. Glutathion

Für Cystein ergab sich bis 1 mM völlige Linearität. Bei GSH war bereits bei 0,7 mM Sättigung erreicht. Die im Testansatz verwendete maximale Konzentration von 500 μ M lag daher noch im optimalen Bereich.



Ansatz:
1 ml DTNB
(1 mM in 98 % MeOH/
2 % 0,1 N NaOH)
+ 100 μ l Testansatz
20 min. Farbstoffbildung
10 min. Zentrifugation
Messung bei 412 nm

Abb.95: Eichgerade für CYS und GSH mit "Ellman-neu"

2.2.3. pH-Einfluß der Reaktion POD-CYS

Tab.45:

System (t=30 min)	pH = 7,8	pH = 5,7
CYS	525 µM	525 µM
CYS + POD	365 µM	453 µM

Bei pH = 5,7 ergibt sich eine um den Faktor 0,86 geringere optische Dichte als bei pH = 7,8 (Ellman-Test ist nur im alkalischen Testmilieu möglich).

Der Abbau im Sauren verläuft erheblich langsamer:

30,5 % Abbau bei pH=7,8 gegenüber nur 13,7 % Abbau bei pH=5,7.

Der Abbau des Ellman-Farbstoffes verlief dagegen im Sauren erheblich rascher!

2.2.4. Kinetik des CYSTEIN-Abbaus durch POD Stimulation durch pHAP

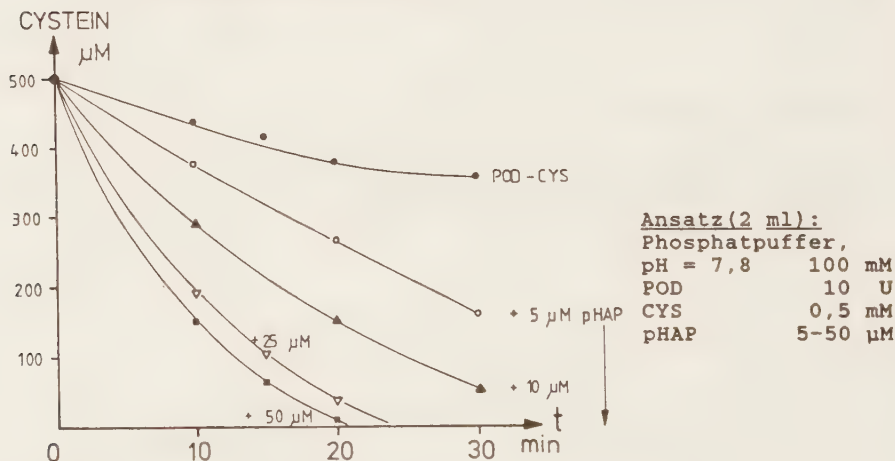


Abb.96: pHAP-Stimulation des CYS-Abbaus

Der Cystein-Abbau erfolgt durch POD allein relativ langsam: nach 30 Minuten Reaktionszeit sind 30 % CYS abgebaut.

Durch bereits sehr geringe pHAP-Konzentrationen wird der Abbau erheblich beschleunigt:

10 µM pHAP steigert den Abbau nach 30 Minuten auf 90%, 25 µM pHAP auf 100 %.

Für eine ausgedehnte Untersuchung des pHAP-Konzentrationseinflusses bieten sich 10 Minuten Reaktionsdauer an.

2.2.5. Einfluß von pHAP auf den CYS-Abbau durch POD

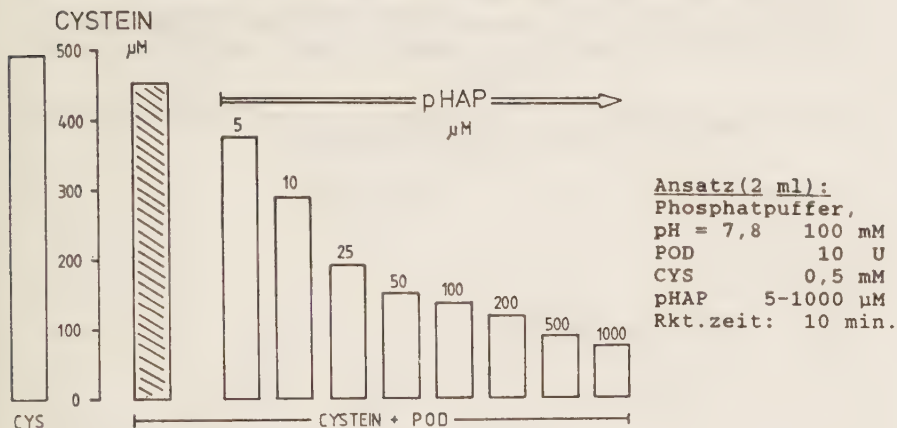


Abb.97: pHAP-Konzentrationsreihe

Bereits geringe Konzentrationen an pHAP führen zu einer deutlichen Beschleunigung des peroxidativen Cystein-Abbaus: 25 μ M pHAP zeigt eine Stimulation um 58 % des CYS-Abbaus durch POD allein.

2.2.6. SOD-Einfluß auf den peroxidativen CYSTEIN-Abbau

2.2.6.1. SOD-Einfluß auf das Grundsystem: CYS-POD

Zum Grundansatz POD-CYS werden steigende SOD-Konzentrationen zugegeben.

Nach 10 min. Reaktionszeit wird gestoppt:

System	CYSTEIN (μ M)	%
POD-CYS	502	100,0
+ 1 U SOD	495	98,6
+ 5 U SOD	472	94,0
+ 10 U SOD	453	90,2
+ 50 U SOD	427	85,1
+ 100 U SOD	404	80,5

Tab.46: SOD-Einfluß auf POD-CYS

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM POD 10 U
 CYS 0,5 mM SOD 1-100 U

Durch Peroxidase allein erfolgt kein deutlicher CYSTEIN-Abbau innerhalb 10 Minuten.
Durch steigende U SOD wird der Abbau meßbar beschleunigt.
Allerdings ist die Wahl einer längeren Reaktionszeit sinnvoll.

CYSTEIN-Abbau/Stimulation durch SOD Prozentuale Stimulation
10 Minuten Reaktionszeit

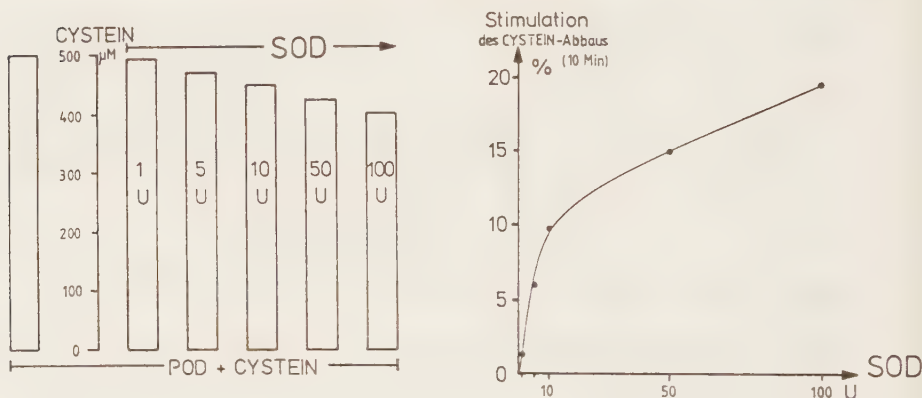


Abb.98: SOD-Einfluß des Cysteinabbaus durch POD

SOD - Einfluß auf die Grundreaktion POD - CYS

Reaktionszeit : 30 Minuten

Ansatz	$\bar{n}$	$\bar{x} E_{412 \text{ nm}}$	$\bar{s} n$	$\mu\text{M CYS}$	$\bar{s} n$	%
CYSTEIN	8	652	38	489	29	---
CYS - POD	8	492	61	369	46	100
+ 10 SOD	5	458	24	344	18	93
+ 20	4	343	30	257	23	70
+ 50	5	319	51	239	38	65
+ 100	5	284	76	213	56	58
+ 200	5	178	38	134	28	36
+ 500	4	99	18	74	14	20
+ 1000	6	92	12	69	9	19

Ansatz (2 ml):
Phosphatpuffer,
pH=7,8 100 mM
POD 10 U
CYS 0,5 mM
SOD 100 U
Rkt.zeit: 30 min.
Farbbdg.: 20 min.
Zentrif.: 10 min.

Tab.47: SOD-Stimulation des CYS-Abbaus durch POD

Durch POD wurden in 30 Minuten nur 25 % CYS abgebaut.
Durch steigende U SOD wurde dieser Grundabbau deutlich stimuliert.

30 Minuten Reaktionszeit

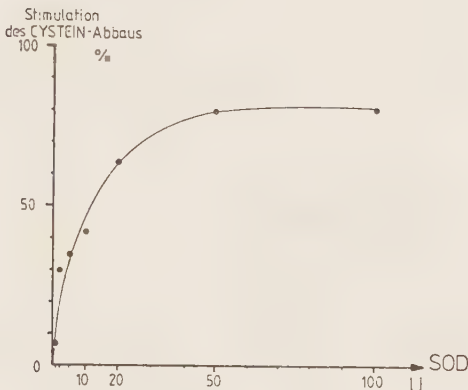


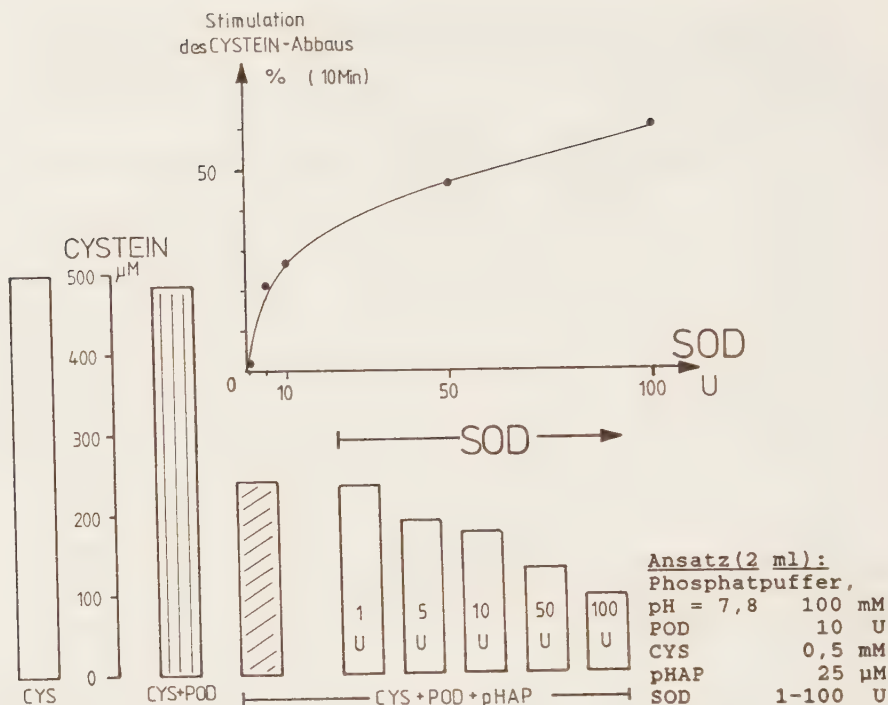
Abb.99: SOD-Stimulation des CYS-Abbaus durch POD

2.2.6.2. SOD-Einfluß auf das System POD-CYS-pHAP

Steigende SOD-Konzentrationen, zum System POD-CYS-pHAP zugegeben, ergeben nach 10 Minuten folgende Cystein-Konzentration:

System	(μ M) Cystein	%
POD-CYSTEIN	483	-
POD-CYSTEIN + pHAP	238	100
↓		
↓		
↓		
+ 1 U SOD	234	98,3
+ 5 U SOD	187	78,6
+ 10 U SOD	174	73,1
+ 50 U SOD	128	53,8
+ 100 U SOD	94	39,5

Die deutliche Erhöhung der Abbau-Rate durch pHAP wird mit steigender Konzentration SOD innerhalb von 10 Minuten nochmals beschleunigt.



Tab.48/Abb.100: SOD-Stimulation auf die Reaktion POD-CYS-pHAP

2.2.7. Hemmstoffe: Einfluß auf den Cystein-Abbau durch POD

2.2.7.1. SOD-Katalase - Ascorbat

Einfluß auf die Grundreaktion: CYS + POD

Die Cystein-Konzentration bleibt ohne Peroxidase völlig unverändert.

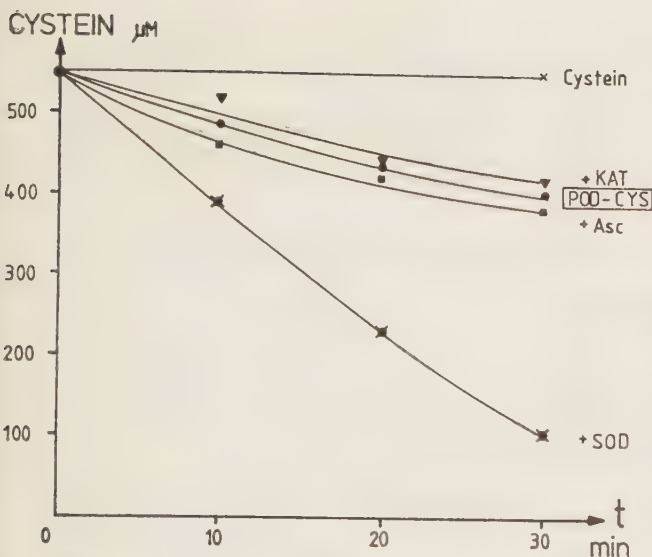
POD baut innerhalb von 30 Minuten CYS geringfügig ab.

Durch das Antioxidans Ascorbat bleibt die Reaktion unverändert.

Ebenso zeigt Katalase keinen signifikanten Hemmeffekt. SOD bewirkt die schon erwähnte deutliche Stimulation.

System (30 Min. Rkt.zeit)	µM Cystein
CYSTEIN + H ₂ O ₂	15

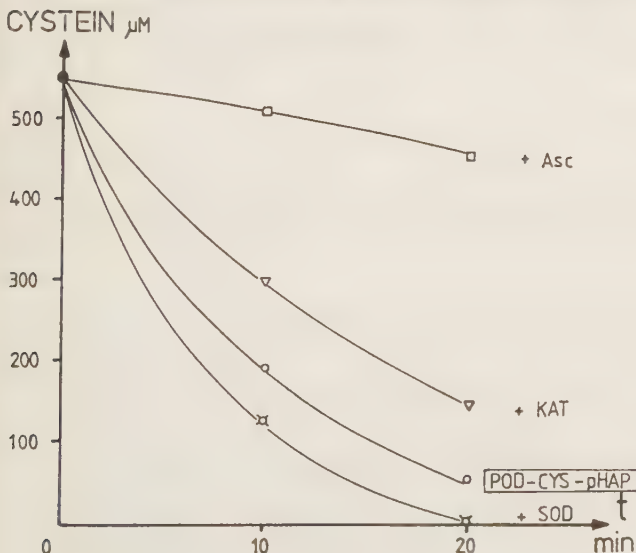
H₂O₂ baut innerhalb von 30 Minuten 500 µM Cystein allein bis auf 15 µM ab.



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,55 μM
 SOD 100 U
 KAT 100 U
 Asc 0,5 mM

Abb. 101: Hemmstoffe auf Cystein-Abbau durch POD

Einfluß von SOD-KAT-Asc auf POD-CYS + pHAP



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,55 mM
 SOD 100 U
 KAT 100 U
 Asc 0,5 mM

Abb. 102: Hemmstoff-Einfluß auf den Cystein-Abbau durch POD-pHAP

Die durch pHAP katalysierte Grundreaktion POD-CYS zeigt innerhalb 30 Minuten fast völligen CYS-Abbau; SOD stimuliert diesen Abbau sichtbar.

Katalase dagegen hat einen hemmenden Einfluß.

Ascorbat mindert den Abbau sehr drastisch; die Ascorbat-Kurve ist deckungsgleich mit der CYS-POD-Grundreaktion, d.h. Asc hemmt den pHAP-Einfluß bis auf die Grundreaktion.

2.2.7.2. Einfluß der Radikalfänger Mannit und Formiat auf POD-CYS

Reaktionszeit: 20 Minuten	Cystein (μ M)
System: POD-CYS	460
POD-CYS + Formiat	446
POD-CYS + Mannit	443

Tab.49: Formiat-/Mannit-Einfluß auf POD-CYS

Im nichtphenolischen Abbausystem POD-Cystein zeigen die allgemeinen Radikalfänger Formiat bzw. Mannit keinerlei Hemmung.

Reaktionszeit: 20 Minuten	Cystein (μ M)
System: POD-CYS - pHAP	53
POD-CYS - pHAP + Formiat	55
POD-CYS - pHAP + Mannit	60

Tab.50: Formiat- und Mannit-Einfluß auf CYS-POD-pHAP

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer,

pH = 7,8	100 mM	POD	10 U
CYS	0,5 mM	pHAP	25 μ M

Die durch pHAP-stimulierte Reaktion wird durch Mannit und Formiat ebensowenig beeinflusst wie die unkatalysierte.

2.2.8. Vergleich zwischen Glutathion und Cystein

Analog zu Cystein läßt sich GSH ebenfalls mit dem abgewandelten Ellman-SH-Nachweis quantifizieren. Der molare Extinktionskoeffizient ist annähernd gleich.

Der prozentuale Abbau innerhalb von 30 Minuten beträgt bei GSH durch POD nur 5,2 %, während er bei CYS 27,1 % beträgt. Die Reaktion GSH-POD ist deutlich pHAP-stimulierbar; allerdings ist die Stimulation erheblich geringer: durch 500 μ M pHAP sind immerhin noch 19,3 % GSH vorhanden, während im CYS-Abbau ebenfalls nach 30 Minuten schon durch 25 μ M pHAP völliger Abbau erreicht wird.

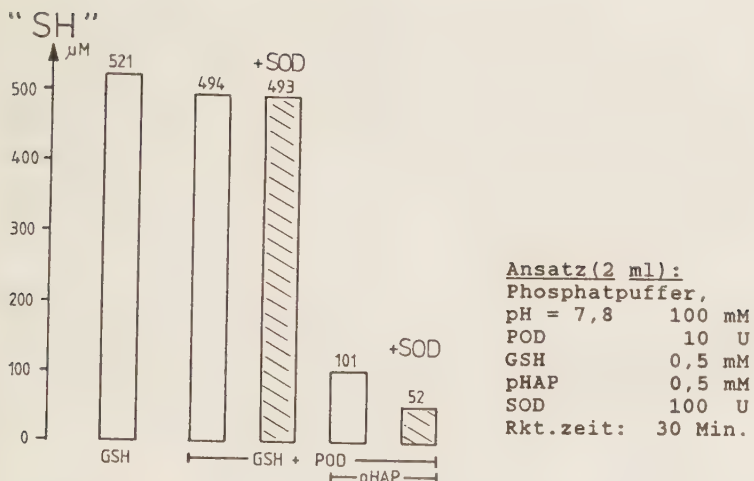


Abb.103: GSH-Abbau durch POD/pHAP- und SOD-Einfluß

Im Gegensatz zur Stimulation durch SOD im System POD-CYS ist beim peroxidativen Abbau von GSH kein Einfluß von SOD festzustellen.

Die pHAP-stimulierte Reaktion POD-GSH wird dagegen durch SOD um 50 % beschleunigt.

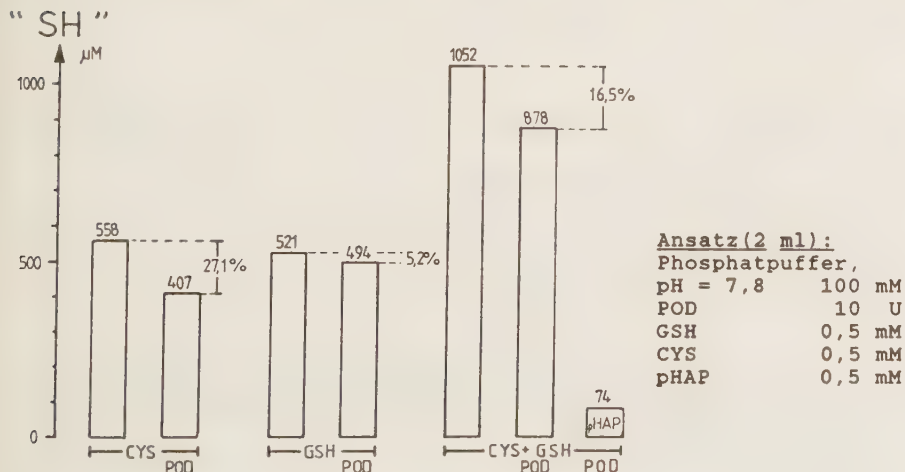


Abb.104: POD-Einwirkung auf ein GSH-CYS-Gemisch

Der CYS-Abbau durch POD beträgt in 30 Minuten 27,1 %, der von GSH 5,2 %.

Sollte keine Beeinflussung von CYS durch GSH vorliegen, so wird ein Mittelwert von 16,2 % erwartet. Tatsächlich liegt der Abbau einer Mischung von GSH und CYS (jeweils 0,5 mM) durch POD bei 16,5 %.

Ebenso zeigt die pHAP-stimulierte Reaktion keine Beeinflussung der beiden Substrate gegeneinander.

2.3. HPLC-Trennung: Quantifizierung von pHAP während des peroxidativen Cystein-Abbaus

S Y S T E M	Reaktionszeit (min)	
	t = 0	t = 40
POD - CYS - pHAP	495	500
POD - CYS - pHAP - SOD	520	501
POD - CYS - pHAP - NH ₂ OH	496	499
POD - CYS - pHAP - NH ₂ OH - SOD	490	495
POD - CYS - pHAP - Crocin	497	505
POD - CYS - pHAP - Crocin - SOD	496	510

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,
pH = 7,8 100 mM
POD 10 U
CYS 0,5 mM
pHAP 0,5 mM
NH₂OH 0,5 mM
Crocin 10 µM
SOD 100 U

Tab.51: pHAP-Quantifizierung (µM) in verschiedenen CYS-Systemen

Für jedes System und für jede Zeit wurden getrennte Ansätze durchgeführt. Zum Zeitpunkt t = 0 enthielt der entsprechende Ansatz keine POD.

5 µl des Testansatzes wurden über HPLC getrennt.

5 µl = 2,5 nmol eingesetztem pHAP bzw. 500 µM pHAP im Ansatz. HPLC-Trennung erfolgte über eine ERC-Säule Hypersil-ODS-5 µm, 125 x 4 mm ID Fluß: 1 ml/min.

Eluent: isokratisch H₂O-MeOH (60:40 %) (+2 % Eisessig)

pHAP wurde bei 280 nm mit einer Empfindlichkeit von 0,05 OD detektiert; als Retentionszeit ergaben sich 2,9 Minuten.

In keinem der beschriebenen CYSTEIN-POD-Systeme wurde innerhalb der 40 Minuten Reaktionszeit (es wurden auch 5 - 10 - 20 - 30, teils auch 80 Minuten-Ansätze durchgeführt) ein pHAP-Abbau festgestellt.

Der Cystein-Abbau war bereits nach 10 Min. Reaktionszeit vollständig erfolgt!

Bei der pHAP-Wirkung handelt es sich folglich um einen katalytischen Eingriff in den CYSTEIN-Abbau.

2.4. Hydroxylamin-Oxidation

2.4.1. pHAP-Einfluß auf NH_2OH -Oxidation

System	ng NO_2^- /Ansatz	
	pH = 5,7	pH = 7,8
POD	0	4
POD-pHAP	20	60
POD-CYS	20	80
POD-CYS + pHAP	440	4320

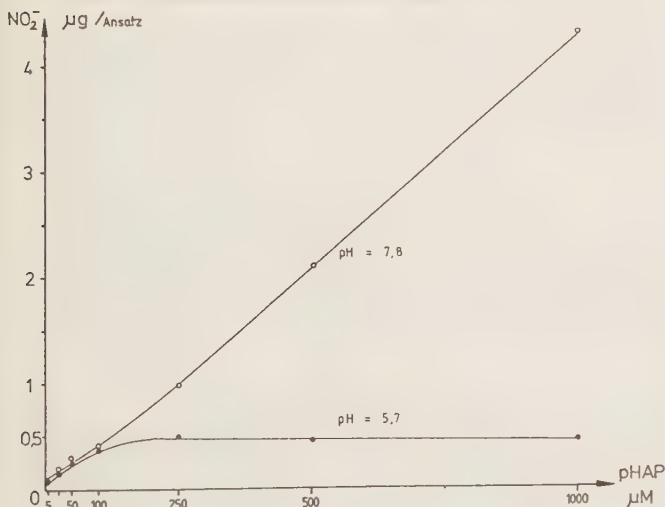
Tab.52: NH_2OH -Oxidation durch POD-CYS-pHAP

Erst bei pHAP-Anwesenheit ist das System POD-CYS in der Lage, Hydroxylamin zu oxidieren (um den Faktor 10 bei pH = 7,8 deutlicher). Die Nitrit-Bildung der Systeme ohne pHAP liegt unterhalb der gut erfaßbaren Meßgrenze.

Ansatz (2 ml): Phosphatpuffer, pH=5,7 bzw. 7,8 100 mM POD 10 U
 CYS 0,5 mM pHAP 1 mM
 NH_2OH 0,5 mM Rkt.zeit: 30 min.
 + 500 μl Sulfanilamid 1 %
 + 500 μl Naphtylethylendiamin 0,02 %
 Farbstoffentwicklung: 20 Minuten/ Messung: 540nm

Verdoppelung der Cystein-Konzentration führt zu keiner (deutlichen) Steigerung der Nitrit-Bildung.

pHAP-Konzentrationsreihe bei pH = 7,8 bzw. 5,7



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 5,7/7,8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,5 mM
 pHAP 5-1000 μM
 NH_2OH 0,5 mM
 Rkt.zeit: 30 Min.
 Farbstoffbdg: 20 Min.

Abb.105: pHAP-Einfluß auf NO_2^- -Bildung durch CYS-POD-pHAP

Der Konzentrationseinfluß von pHAP verläuft bei pH = 7,8 und pH = 5,7 bis ca. 100 µM linear; bei pH = 5,7 ist dann das System gesättigt, während im Alkalischen die lineare Abhängigkeit über einen großen Bereich weiterbesteht.

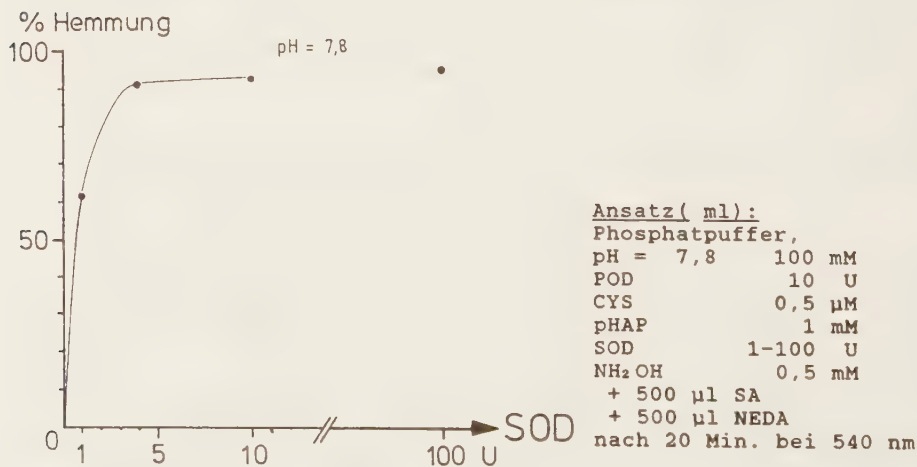
2.4.2. SOD-Hemmung der Nitrit-Bildung

Die spezifische Oxidationskraft für die Nitrit-Bildung aus NH_2OH , eines der $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Merkmale, wurde versucht durch steigende Konzentration an SOD zu hemmen.

System	ng NO_2^-	
	pH = 7,8	pH = 5,7
POD-CYS	50	30
POD-CYS + 100 U SOD	50	30
POD-CYS + pHAP	4320	450
↓ + 1 U SOD	1670	260
↓ + 5 U SOD	370	180
↓ + 10 U SOD	310	100
↓ + 50 U SOD	270	100
↓ + 100 U SOD	200	30

Bereits 1 U SOD hemmt die NH_2OH -Oxidation durch POD-CYS-pHAP zu mehr als 50 %; bei 5 U SOD ist die Hemmung fast vollständig.

Dieser deutliche SOD-Effekt ist bei pH = 7,8 wesentlich stärker ausgeprägt.



Tab.53/Abb.106: Hemmung der NO_2^- -Bildung durch SOD

2.4.3. Vergleich der NH_2OH -Oxidation durch die peroxidativen Systeme:

CYSTEIN - Glutathion - HSO_3^- - H_2O_2

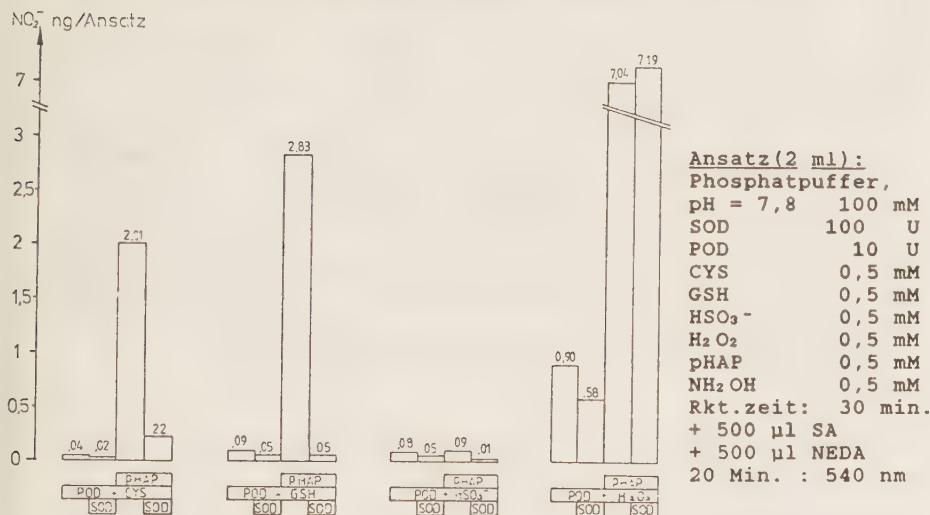


Abb. 107: Hydroxylamin-Oxidation durch verschiedene POD-Systeme

Cystein und Glutathion verhalten sich bezüglich der peroxidativen NH_2OH -Oxidation analog:

POD-CYS bzw. POD-GSH bildet nur minimal Nitrit; durch SOD wird dieser geringe Wert noch weiter verringert.

Im phenolisch-stimulierten System entsteht in 30 Minuten Nitrit in höheren Konzentrationen.

Durch SOD wird die Reaktion auf 11 % bei CYS bzw. bis auf 2 % bei GSH gehemmt.

Natriumbisulfit stimuliert den sehr geringen Nitrit-Wert kaum, der auch durch pHAP nicht beeinflußt wird.

H_2O_2 dagegen kann im Grundsystem ohne Phenol NH_2OH oxidieren. Diese Rate wird durch SOD auf 64 % gehemmt.

Durch pHAP wird die Reaktion sehr stark stimuliert; in diesem System zeigt SOD keinerlei Einfluß!

2.4.4. Einfluß von Crocin auf die NH_2OH -Oxidation

Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurde die Reaktion POD-CYS-Crocin- NH_2OH durch Sulfanilamid und Naphtylethylendiamin gestoppt; bei 440 nm wurde die Crocin-Konzentration, bei 540 nm die NO_2^- -Konzentration ermittelt.

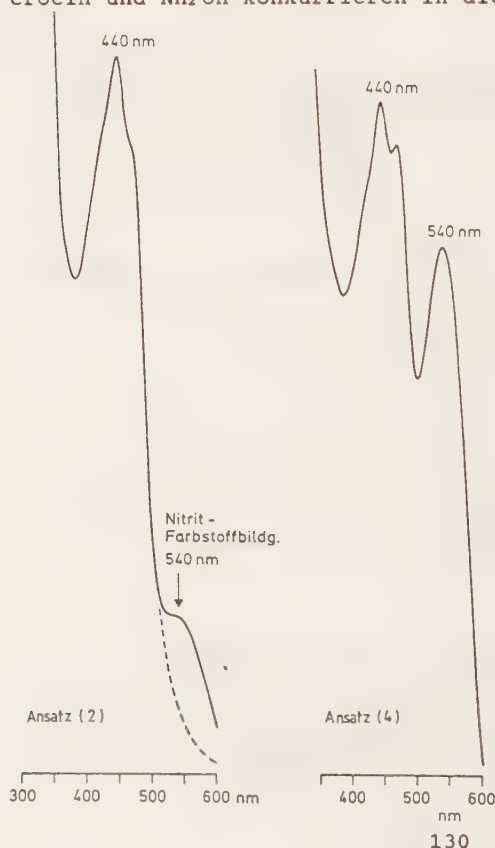
System	(ng)NO ₂ ⁻	(μM) Crocin
(1) POD-CYS	85	---
(2) POD-CYS + Crocin	70	1,3
(3) POD-CYS + pHAP	2670	---
(4) POD-CYS + pHAP + Crocin	1620	1,8

Tab.54: Crocin-Einfluß auf Nitrit-Bildung
(Ansatz: siehe Abb.108)

Die minimale Nitrit-Bildung des Nicht-Phenol-stimulierten Systems(1) wird durch Crocin nicht verändert(2). Deutlich ist dagegen die Crocinbleichung (84 %) durch dieses POD-CYS-System.

Eine schnelle NH₂OH-Oxidation zeichnet das System POD-CYS+pHAP(3) aus; ebenso wird Crocin(4) gebleicht, allerdings mit einer geringfügig langsameren Rate (78 %: pHAP müßte ja beschleunigen!).

Auffallend ist die um 39 % geringere NO₂⁻-Bildung: Crocin und NH₂OH konkurrieren in dieser Reaktion.

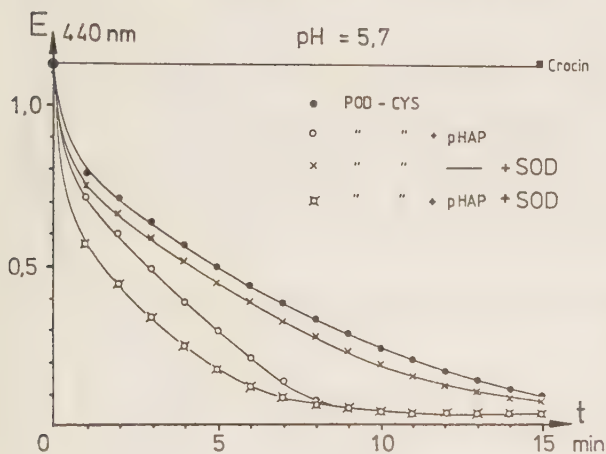


Ansatz(2 ml):
 Phosphatpuffer,
 pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,5 mM
 ± pHAP 0,5 mM
 ± Crocin 8,2 μM
 NH₂OH 0,5 mM
 Rkt.zeit: 30 Min.
 + 500 μl SA
 + 500 μl NEDA
 20 Minuten /540 nm

Abb.108: Spektren eines
CYS-POD-pHAP -
Ansatzes mit
Crocin + NH₂OH

2.5. CROCIN-Bleichung

2.5.1. Einfluß des pH-Wertes auf die SOD-Wirkung



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH=5,7/7,8 100 mM
 CYS 0,5 mM
 POD 10 U
 pHAP 0,5 mM
 SOD 100 U
 Crocin 8,4 μ M
 Rkt.zeit: 15 min.

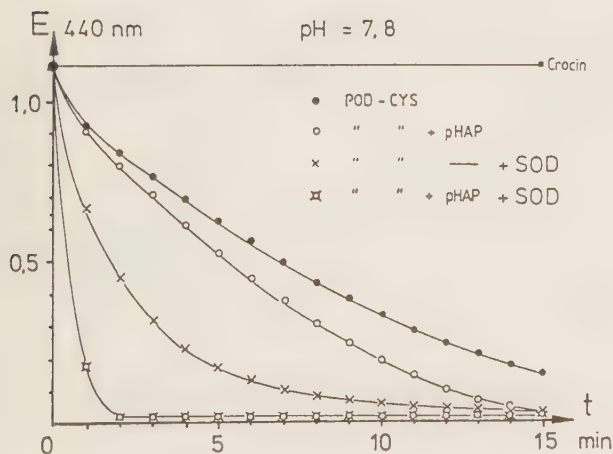


Abb.109/110: Einfluß des pH-Wertes auf die Crocin-Bleichung durch POD-CYS $\pm$ pHAP

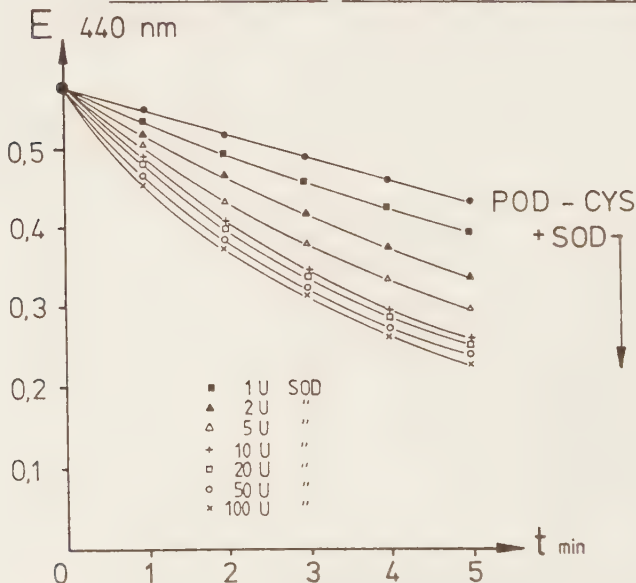
Die Bleichungsrate durch die Grundreaktion POD-Cystein unterscheidet sich bei den pH-Werten 5,7 und 7,8 nur unwesentlich. Die Bleichung von Crocin wird durch Zugabe von pHAP bei beiden Bedingungen stimuliert; sie ist bei saurem pH-Wert etwas deutlicher.

Superoxid-Dismutase hat im Sauren auf die Grundreaktion nahezu keinen Einfluß, auf die phenolisch-stimulierte Reaktion bewirkt sie nur eine geringe Steigerung. Einen drastischen Effekt zeigt SOD im schwach alkalischen Bereich.

Die Grundreaktion wird durch SOD deutlich beschleunigt. Die Reaktion POD-CYS + pHAP wird so stark stimuliert, daß bereits nach weniger als 2 Minuten kein Farbstoff mehr vorhanden ist. RSA zeigt keinen Einfluß. Für alle weiteren Untersuchungen wurde deshalb pH = 7,8 gewählt.

Eine Verdoppelung der Crocin-Konzentration zeigt eine Verlangsamung des Reaktionsverlaufs (5,7: in keinem System nach 30 Minuten völlige Bleichung /7,8: nur mit pHAP auf Null), allerdings wird an der grundsätzlichen Beeinflussung durch pHAP und SOD bei den beiden pH-Werten nichts verändert.

2.5.2. SOD-Stimulation: Konzentrationsabhängigkeit



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,5 mM
 Crocin 4,1 µM
 SOD 1-100 U
 Rkt.zeit: 5 Min.
 (5-facher Ansatz)

Abb.111: SOD-Effekt auf POD-CYS und Crocin

Es zeigt sich, daß der unter 5.1. beschriebene stimulierende Effekt von SOD sowohl auf die Grundbleichungsreaktion POD-CYS, als auch auf die phenolisch verstärkte Reaktion konzentrationsabhängig zum Tragen kommt. Bei der Grundreaktion ist die Stimulation in einem engeren Rahmen wirksam; ab 10 U bis 100 U tritt nur noch eine geringfügige Stimulation auf. Drastisch ist der SOD-Effekt bei der pHAP-verstärkten Reak-

tion. Nach 2 Minuten Bleichungsreaktion ist zwischen geringem Crocin-Abbau ohne SOD und fast völligem Abbau durch Zugabe von 100 U SOD die ganze Bandbreite des Effekts möglich. Die 100 U entsprechende RSA-Konzentration zeigt keinerlei Wirkung.

SOD-konzentrationsabhängige Stimulation der Reaktion POD - CYSTEIN - pHAP

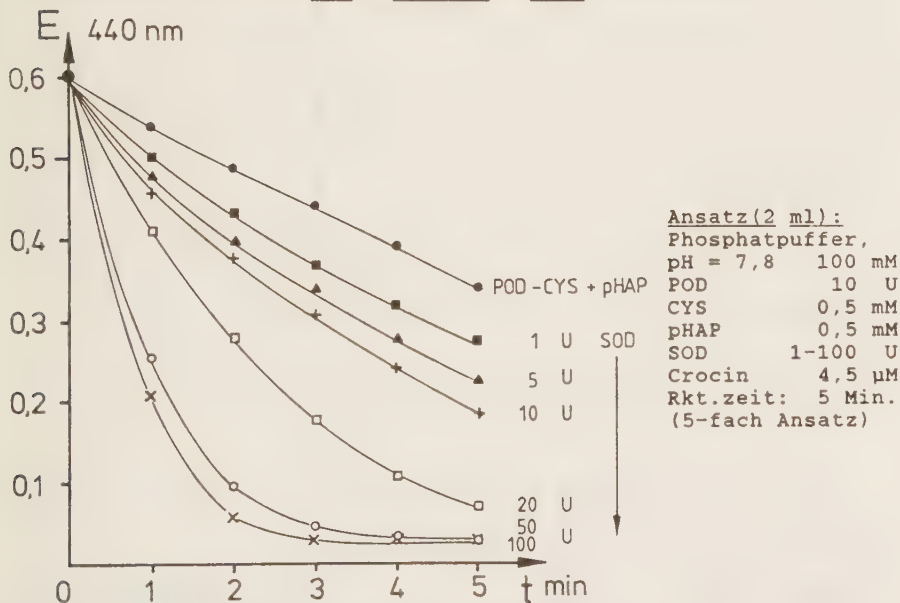


Abb.112: SOD-Effekt auf POD-CYS-pHAP

2-Minuten-Werte der Crocinbleichung als Prozent der Grundbleichungsreaktion POD-CYS + pHAP:

SOD-Konzentrationsabhängige Stimulation der Bleichung

1 U	12 %
5 U	19 %
10 U	24 %
20 U	43 %
50 U	80 %
100 U	89 %

: Tab. 55

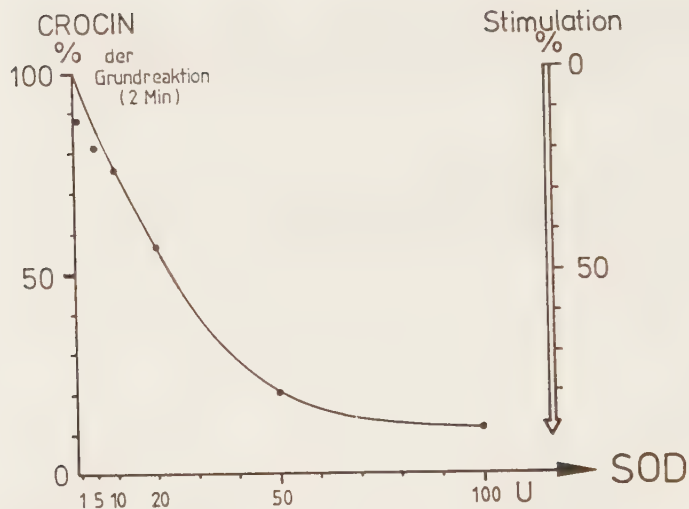
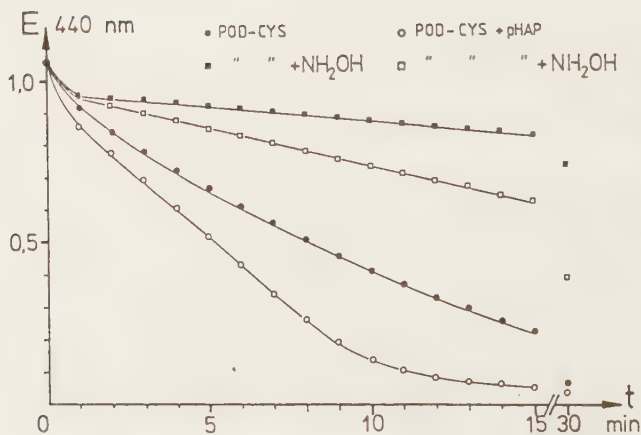


Abb.113: Prozentuale Stimulation der Bleichung

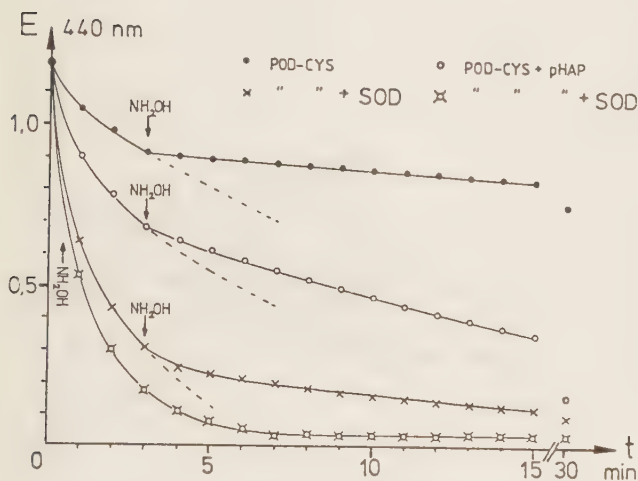
2.5.3. Hydroxylamin: Konkurrenz zu Crocin



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 NH₂OH 0,5 mM
 Rkt.zeit: 30 Min.

Abb.114: NH₂OH-Oxidation als Konkurrenzreaktion der Crocin-Bleichung

Vergleich mit der Grundbleichungsrate durch POD-CYS zeigt eine deutliche Hemmung des Reaktionsablaufes. Die Hemmung durch NH_2OH wirkt sich ebenfalls auf die pHAP-stimulierte Reaktion aus. Der Unterschied zwischen stimulierter- und Grundreaktion wird auch in NH_2OH -Anwesenheit sichtbar, allerdings mit einer erheblich geringeren Bleichungsrate.



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer, pH=7,8 100 mM
 POD 10 U
 CYS 0,5 mM
 pHAP 0,5 mM
 NH_2OH 0,5 mM
 SOD 100 U
 Crocin 89 μM
 Rkt.zeit: 30 Min.

Abb.115: Hemmung der Crocin-Bleichung durch NH_2OH

Die spätere Zugabe (3 Min.) von NH_2OH zu einer bereits Crocin-bleichenden Reaktion zeigt eine sehr deutliche Hemmung in allen Fällen gegenüber der Rate ohne NH_2OH (gestrichelte Linie).

Das Charakteristikum der pHAP-Stimulation bleibt auch noch 3 Minuten erhalten, allerdings verlangsamt. Deutlich wird die Hemmung der SOD-Stimulation: Die Reaktion $\text{POD} - \text{CYS} + \text{SOD}$ zeigt den gleichen Verlauf wie die Bleichung ohne SOD.

In die äußerst heftige Reaktion $\text{POD-CYS-pHAP} + \text{SOD}$ mußte NH_2OH bereits nach 30 Sekunden zugegeben werden. Schwierigkeiten bereitet das Auffinden des Zeitpunktes, bei dem eine extrem schnelle in eine sehr rasche Bleichungskurve übergeht. Deutlich ist hier allerdings eine Hemmung der Bleichung.

3. Peroxidatischer Sulfit-Abbau

3.1. Eichkurve

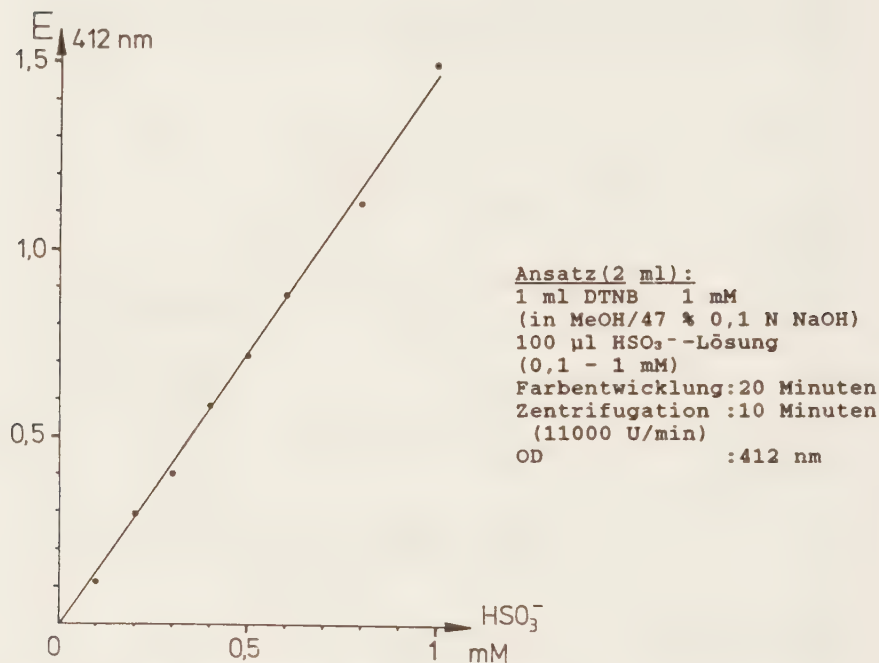
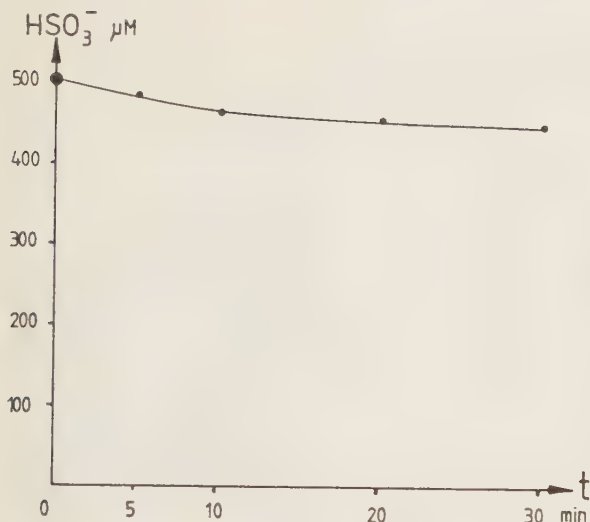


Abb.116: HSO_3^- -Eichkurve mit "Ellman-neu"

Da Peroxidase den durch HSO_3^- mit DTNB gebildeten Farbstoff (analog Ellman-Test mit CYS) als Substrat abbaut, mußte auch hier in MeOH gemessen werden. Die deutlich geringere Empfindlichkeit des Tests gegenüber Bisulfit wurde durch eine Erhöhung des NaOH-Anteils umgangen. Im verwendeten Konzentrationsbereich von 100-1000 μM HSO_3^- zeigt sich völlige Linearität der Farbstoffintensität.

3.2. Sulfit-Abbau durch gelösten Sauerstoff

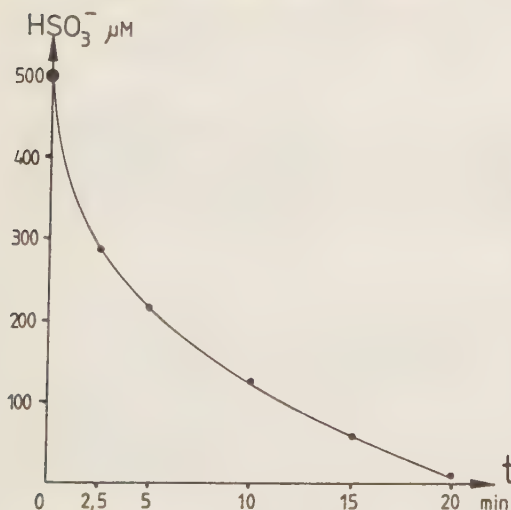
Der im Puffer gelöste Luftsauerstoff führt zu einer geringen Abnahme (10 % / 30 min) der eingesetzten Sulfit-Konzentration.



Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer,
 pH = 7,8 100 mM
 HSO₃⁻ 500 μM
 DTNB 1 mM
 (MeOH/4,2% 0,1N NaOH)
 20 min. Farbbildung
 10 min. Zentrifugation
 OD: 412 nm

Abb.117: Autoxidation von Bisulfit

3.3. Kinetik des Sulfit-Abbaus durch Peroxidase



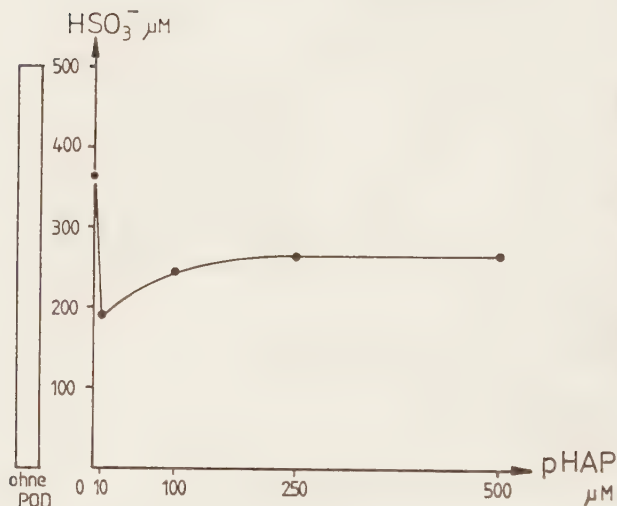
Ansatz (2 ml):
 Phosphatpuffer,
 pH = 7,8 100 mM
 POD 10 U
 HSO₃⁻ 0,5 mM

je 100 μl Lösung +
 1 ml DTNB
 (MeOH/ 4% 0,1 NNaOH)
 Farbstoffbildung:
 20 Minuten
 Zentrifugation:
 10 Minuten
 OD: 412 nm

Abb.118: Kinetik des HSO₃⁻-Abbaus durch POD

Gegenüber der Autoxidation von HSO₃⁻ wird der Abbau durch Peroxidase stark beschleunigt.
 Nach 5 Minuten sind bereits 65 % abgebaut, nach 25 Minuten ist das gesamte HSO₃⁻ oxidiert.

3.4. Einfluß von p-Hydroxyacetophenon



Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,
pH = 7,8 100 mM
POD 10 U
HSO₃⁻ 0,5 mM
pHAP 5-500 µM

Rkt.zeit: 1 Min.
je 100 µl Lösung in
1 ml DTNB
(MeOH/4 % 0,1 NaOH)
Farbbildung: 20 Min.
Zentrif. :10 Min.
OD :412 nm

Abb. 119: pHAP-Einfluß auf die HSO₃⁻-Oxidation durch POD

Bereits geringste pHAP-Konzentrationen führen zu einer deutlichen Stimulation des Bisulfit-Abbaus durch Peroxidase. 5 µM pHAP bewirken eine Beschleunigung des Abbaus um 46 %; die Erhöhung der pHAP-Konzentration hat keine weitere Stimulation zur Folge, ab 10 µM sinkt sogar der Verstärkereffekt ab.

3.5. Hemmstoffe der POD-katalysierten HSO₃⁻-Oxidation

Es wurde der Einfluß verschiedener Hemmstoffe untersucht. Dabei wurde der 5-Minuten-Meßpunkt bei der Grundreaktion, der 1-Minuten-Punkt bei der pHAP-verstärkten Reaktion zum Vergleich herangezogen.

SOD hemmt den Abbau völlig, ebenso Natriumascorbat.

Der universelle Radikalfänger Propylgallat hemmt die Oxidation nahezu vollständig.

Durch Katalase sowie Mannit und Formiat wird der Abbau geringfügig beschleunigt.

Die Beobachtungen gelten sowohl für die stimulierte als auch unstimulierte Reaktion.

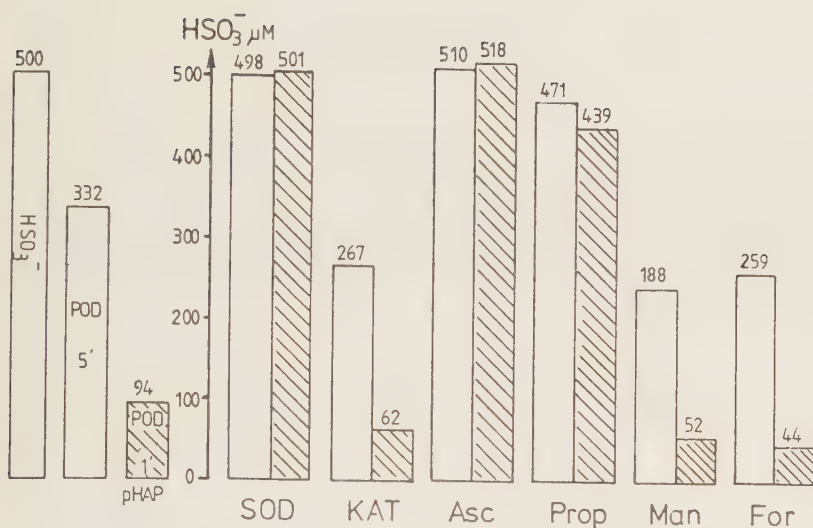


Abb.120: Hemmstoffwirkung auf HSO_3^- durch POD ($\pm$ PHAP)

Ansatz (2 ml):

Phosphatpuffer,

pH = 7,8

HSO_3^-

SOD

Asc

Man.

100 mM

0,5 mM

100 U

0,5 mM

0,5 mM

POD

PHAP

KAT

Prop.

Form.

10 U

0,5 mM

100 U

0,5 mM

0,5 mM

Reaktionszeit: 5 Min. (bei PHAP 1)

100 μl in 1 ml DTNB

20 Minuten Farbbildung

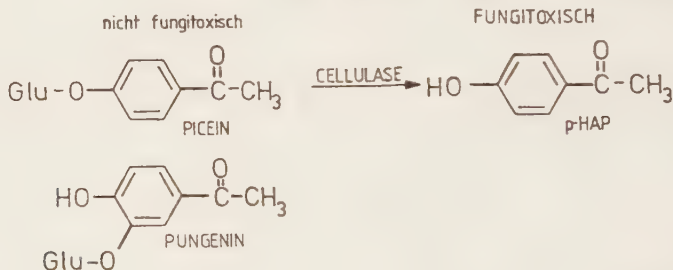
10 Minuten Zentrifugation

OD bei 412 nm

DISKUSSION

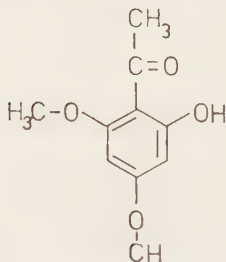
p-Hydroxyacetophenon

Die in der vorliegenden Arbeit aus Fichtennadeln isolierte fungitoxische Substanz wurde durch NMR- und IR-Spektren (siehe Abb. 8,9/ Tab.1) eindeutig als p-Hydroxyacetophenon charakterisiert (Osswald et al., 1987). Diese Verbindung war schon lange als phenolischer Inhaltsstoff von Fichtennadeln bekannt (Hegenauer, 1962/Esterbauer et al., 1974), ebenso wie die Glucoside Picein und Pungenin schon von Dittrich (1970) und Niemann (1979) beschrieben wurden.



(Osswald und Elstner, 1986)

Neu ist die Kenntnis seiner Wirkung als präformiertes Fungizid auf Cladosporium cucumerinum und speziell der hemmende Einfluß auf Forstpathogene, wie z.B. Rhizosphaera kalkhoffii Buback.



Eine Verbindung aus der "Acetophenon-Familie" wurde bereits von Hartmann und Nienhaus (1974) beschrieben. Xanthoxilin (2-Hydroxy-4,6-dimethoxy-acetophenon) zeigt fungitoxische Eigenschaften gegenüber dem Gummosis auslösenden Pilz Phytophthora citrophthora auf Citrus-Arten.

Der Biotest (Hqmans and Fuchs, 1970) zeigt für pHAP-Konzentrationen > 1 mM Hemmung des Pilzwachstums (Abb. 5), was zwar einem sehr unspezifischen Toxin entspricht, die Konzentrationen in der Nadel liegen aber im Bereich von "unphysiologischen" 5-8 mM, so daß diese Hemmversuche durchaus relevant sind.

Die aus Fichtennadeln isolierte Substanz pHAP, sowie käufliches pHAP zeigen die gleiche Beziehung zwischen Hemmhofgröße und eingesetzter Konzentration; ebenso tritt die Wirkung gegenüber Cladosporium c. und Rhizosphaera k.B. auf (Tab. 3).

Picein zeigt keine Hemmung des Pilzwachstums.

Schon Esterbauer et al. (1975) zeigten, daß die pHAP- und Picein-Konzentration sehr starken Schwankungen von Baum zu Baum (trotz gleichen Alters, Standorts, gesundheitlichen Zustands) unterworfen sind. Der Piceingehalt liegt aber stets um den Faktor 50-100 über dem von pHAP.

Bei einfachen isokratischen Bedingungen ist die Bestimmung von pHAP sowie den Glucosiden Picein und Pungenin in einem HPLC-Lauf von 20 Minuten bei kurzer Probenaufbereitung möglich (Abb. 7).

Die anfänglichen Extraktionsversuche, die nur bei Chloroform-Extrakten fungitoxische Eigenschaften zeigten, führten zunächst zur falschen Annahme, daß die Substanz nur in der Wachsschicht lokalisiert sei; in der Gesamtnadel ist aber die ca. 10-fache Menge enthalten.

Zuordnungen bestimmter pHAP-Konzentrationen zu einzelnen Schadbildern (Hoque, 1985) sind sehr kritisch zu bewerten, da neben der Schwankungsbreite der Werte der Einzelindividuen, auch die Cellulase-Aktivität deutliche Veränderungen im pHAP-Gehalt bewirkt. Die Summe pHAP + Picein bleibt allerdings konstant.

Belastungsversuche mit Ozon (MAGL-Projekt, GSF München) führten eindeutig zur Abnahme des pHAP-Gehaltes (Osswald et al., 1986).

In dieser Arbeit wurden zahlreiche biochemische Eigenschaften dieser Substanz anhand von Modellreaktionen beschrieben.

SENESZENZ - MODELLREAKTIONEN

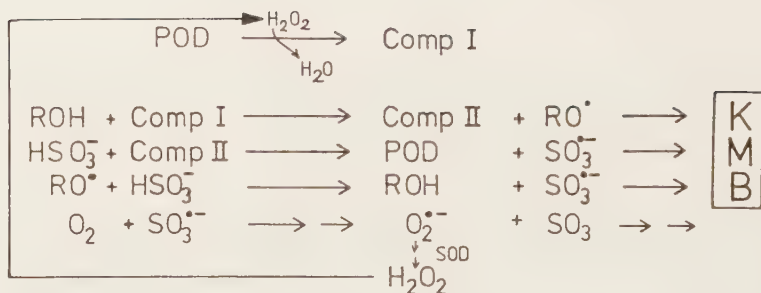
I. Peroxidase-Reaktionen

Durch Peroxidase und H₂O₂ erfolgt nur eine geringe Spaltung des für reaktive Sauerstoffmoleküle spezifischen Monitormoleküls KMB.

Erst durch die Anwesenheit von pHAP entsteht Ethylen (Abb. 15). Das Alkoxy-Radikal ist vermutlich das eigentlich KMB-spaltende Prinzip.

Die HSO₃⁻-Anwesenheit zeigt ebenfalls Verstärkung der KMB-Spaltung (Abb. 16).

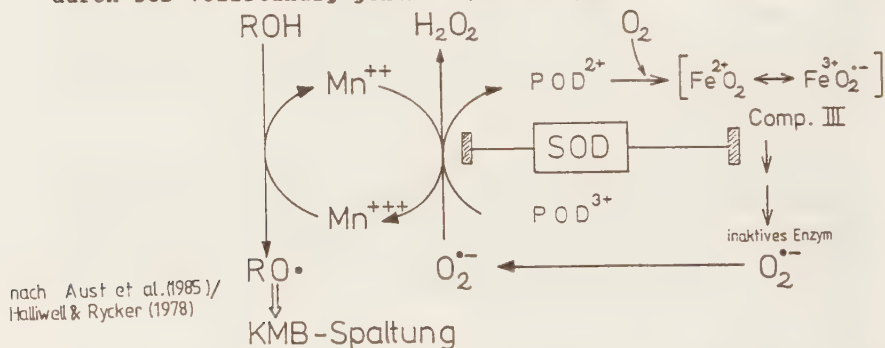
Durch beide Verstärker zusammen wird die Reaktion synergistisch beschleunigt (Abb. 17):



SOD zeigt keinen Einfluß auf die KMB-Spaltung, da das durch Dismutation gebildete H_2O_2 wiederum Comp. I entstehen läßt und somit zur Kettenerhaltung beiträgt. Auch der OH-Fänger Mannit ist ohne Wirkung auf die synergistische Reaktion (Tab.6).

Der überadditive Effekt ist im alkalischen Milieu deutlicher, besonders über die Bisulfit-Wirkung.

Das System Peroxidase-Mangan²⁺ fragmentiert KMB in Anwesenheit des Verstärkers pHAP. Die Reaktion POD-Mn^{2+} -pHAP wird durch SOD vollständig gehemmt (Abb. 24).



$\text{O}_2^{\bullet -}$ reagiert mit Mangan^{2+/3+}, dadurch hemmt SOD die POD-Aktivierung und $\text{RO}^\bullet$ -Bildung.

Die Aufhebung der SOD-Hemmung durch HSO_3^- (Tab. 8) ist eine Umgehung der $\text{Mn}^{2+/3+}$ -getriebenen H_2O_2 -Bildung durch autooxidative Produktion von H_2O_2 über $\text{O}_2^{\bullet -}$.

Die Reaktion mit pHAP und HSO_3^- wird synergistisch beeinflusst, wobei die HSO_3^- -Wirkung im Alkalischen besser zum Tragen kommt, die von pHAP besser im Sauren (Abb. 27).

Für die Reaktion ist nur eine katalytische Mangan-Konzentration erforderlich (Abb. 22), was obigen Mechanismus unterstützt.

Im Gegensatz zum $\text{POD-H}_2\text{O}_2$ -System, das keine ACC-Fragmentierung verursacht, ist das POD-Mn^{2+} -System, bei pHAP- bzw. HSO_3^- -Zusatz, dazu in der Lage (Abb. 28).

Die beiden Verstärker zeigen geringen überadditiven Effekt. In keinem der Systeme ist ein deutlicher Hemmstoff-Effekt durch SOD, KAT oder Man meßbar.

Die beiden Monitormoleküle KMB und ACC lassen somit eine Unterscheidung zwischen dem Comp. I-induzierten Spaltungsmechanismus und einer Übergangsmetall-katalysierten Ethylenbildung zu.

Die Sauerstoff-Zehrung des Mangan-Systems zeigt einen weiteren Unterschied: POD-Mn^{++} -pHAP ist nicht zur Sauerstoffreduktion fähig; erst durch ACC wird nach kurzer Lag-Phase der Verbrauch eingeleitet. KMB kann ACC bezüglich Sauerstoffaufnahme nicht ersetzen!

Thiole wie HSO_3^- , GSH und CYS sind in Anwesenheit von HRP und O_2 in geringem Maße zur Sauerstoff-Reduktion fähig:

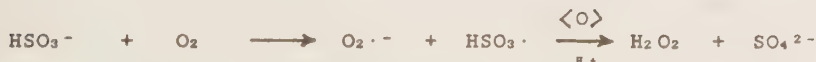


Erst das Phenol pHAP steigert die Rate in derselben Abstufung auf deutliche Werte.

Der bevorzugte Ablauf im schwach Alkalischen (Tab. 36) sowie die Beeinflussung der O_2 -Zehrung durch Katalase zeigen gebildetes H_2O_2 mit POD-CYS (Tab. 39/Abb. 88) an.

Daneben weist die Oxidation von Hydroxylamin zum Nitrit durch POD-CYS-pHAP auf die Entstehung von $\text{O}_2^{\cdot -}$ hin; die Hemmung durch SOD (Tab. 53/Abb. 106) unterstützt diese Annahme.

Für Sulfit gilt vereinfacht:



(Lizada & Yang, 1981)

Gegenüber KMB setzen GSH bzw. CYS mit POD-pHAP geringe Ethylenmengen, HSO_3^- etwas höhere, frei.

Durch Ankopplung von Bisulfit an das System $\text{POD-H}_2\text{O}_2$ wird KMB in deutlichem Maße fragmentiert (Nakamura, 1970). Das Superoxidation reagiert mit Sulfit (Asada und Kiso, 1973/Shimasaki et al., 1980/Shimasaki, 1984):



Das entstehende Sulfit-Radikal erhöht deutlich die aus KMB freigesetzte Ethylenmenge.

Die für die Sulfit-Reaktivität erforderliche Oxidation durch $\text{O}_2^{\cdot -}$ (McCord und Fridovich, 1969/Rabinowich und Fridovich, 1984) wird durch Hemmversuche mit SOD bestätigt.

Die ACC-Spaltung ist bei allen Thiylradikalen vernachlässigbar gering. HSO_3^- bildet aus MET wenig Ethylen, was das $\text{HSO}_3^{\cdot-}$ -Radikal als das reaktivste $\text{RS}^{\cdot}$ erscheinen läßt.

Der Hemmung durch SOD mit POD-HSO_3^- und $-\text{GSH}$ (in mehr oder weniger deutlichen Umfang), steht eine SOD-Stimulation der KMB-spaltenden Reaktion durch POD-CYS gegenüber (Tab. 11). Sowohl die Sauerstoffaufnahme (Tab. 40/ Abb. 89) als auch die KMB-Spaltung (Abb. 32) sind mit steigender SOD-Konzentration stimulierbar.

Eine fast völlige Hemmung der Sauerstoff-Zehrung durch Crocin, ebenso durch NH_2OH , wird mit steigender SOD-Konzentration wieder aufgehoben (Tab. 43,44/Abb. 91,92).

Der Abbau der SH-Funktion von HSO_3^- und GSH / CYS durch POD wird über einen veränderten Ellmann-Test verfolgt.

Der Sulfit-Abbau erfolgt rasch und ist pHAP -stimulierbar (Abb. 119). SOD sowie Asc und Prop hemmen den Abbau völlig.

Die langsame GSH -Oxidation wird nicht von SOD beeinflusst.

Der CYS -Abbau wird durch Asc deutlich, durch KAT geringfügig gehemmt. SOD beschleunigt die CYS -Oxidation.

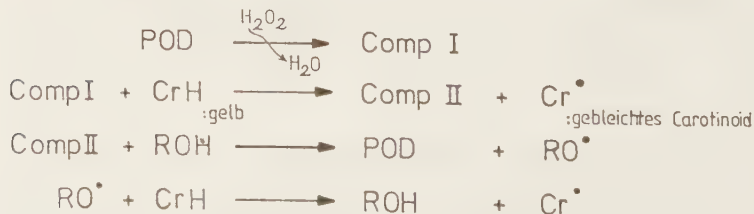
Somit zeigen die untersuchten Thiole große Unterschiede, was den Abbau-Mechanismus angeht.

II. Crocin-Bleichung

Das wasserlösliche Modellcarotinoid Crocin kann neben den beschriebenen lichtgetriebenen produzierenden Sauerstoffradikalen (Youngman, 1983), entsprechend dem Chlorophyllabbau (Elstner & Osswald, 1980) im Dunkeln abgebaut werden.

Analog zu Kato und Shimizu (1985) und anderen Arbeiten (Matile, 1980/Huff, 1981) wurde zunächst vom System $\text{POD-H}_2\text{O}_2$ mit dem Phenol pHAP ausgegangen. Doch bereits $\text{POD-H}_2\text{O}_2$ ist zur Carotin-Bleichung befähigt (Abb. 33).

Durch Zusatz des Phenols wird die Reaktion deutlich vorange-
trieben (Abb. 34).



Durch H-Abstraktion vom Polyeen Crocin wird Comp. I wieder reduktiv "regeneriert". Durch das Alkoxyradikal, das von Bors et al. (1984) für die Bleichung verantwortlich gemacht wird, ist die Reaktion nicht mehr H_2O_2 -limitiert; sie wird zur Kettenreaktion.

Das Glucosid Picein zeigt keine Wirkung auf die Crocin-Oxidation; erst nach cellulytischem Abbau wird die Bleichung beschleunigt (Abb. 35).

Bei vergleichbarer HSO_3^- -Konzentration läuft der Crocin-Abbau unmeßbar schnell ab:

Der aus $POD-H_2O_2$ entstehende Comp. I wird durch HSO_3^- reduziert - HSO_3^- stellt selbst ein bleichendes Agens dar (Mottley & Mason, 1982/Peiser & Young, 1979) - HSO_3^- produziert durch metallkatalysierte Autoxidation selbst H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1969).

Diese Autoxidation der Thiole startet die H_2O_2 -unabhängige Crocin-Bleichung über $RS\cdot$ und H_2O_2 -Produktion. Dadurch, daß Katalase auf keine der Thiol- POD -Reaktionen Hemmwirkung zeigt, dürfte $RS\cdot$ ebenso an der Bleichung beteiligt sein wie Comp.I.

Das Antioxidans Ascorbinsäure zeigt sowohl im H_2O_2 -, wie in allen $RSH-POD$ -Systemen, als auch beim Peroxidase-IAA-System völlige Hemmung des oxidativen Crocin-Abbaus.

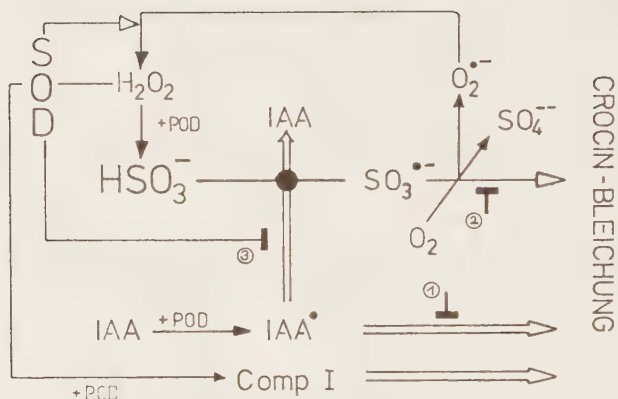
Die IAA-Oxidation durch POD kann mit der Crocin-Bleichung gekoppelt werden. Die im Säuren bevorzugte Reaktion wird durch das Phenol deutlich beschleunigt (Tab. 30).

Picein wird erst nach Cellulase-Abbau zu einem Verstärker der Bleichung (Abb. 63).

Für die Crocin-Bleichung gilt, wie auch für den IAA-Abbau, eine totale Hemmung durch Ascorbat und Propylgallat; Katalase und SOD beeinflussen die Reaktion nicht (Tab. 32).

Durch H_2O_2 -Zugabe verändert sich die Reaktionsgeschwindigkeit nicht: Sowohl IAA als auch Comp.I. sind bleichende Oxidantien. Allerdings verschwindet der Ascorbat-Schutz nach H_2O_2 -Zugabe; das Antioxidans wird durch $POD-H_2O_2$ abgebaut, nicht durch $POD-IAA$, danach kann Bleichung einsetzen (Abb.66).

Bisulfit kann gegenüber IAA als Radikalfänger wirken, die Bleichung wird verzögert ①. Die als Folge entstandenen $SO_3\cdot^-$ Radikale sind gegenüber Crocin geringer reaktiv, da Wechselwirkung mit Sauerstoff erfolgt ②.



Das als Folge des Schwefeltrioxidradikals gebildete $O_2^{\cdot-}$ ist nicht direkt zur Crocin-Bleichung fähig (eigene Untersuchungen mit X/XOD brachten keine Pigmentoxidation). $O_2^{\cdot-}$ wirkt nun seinerseits auf den Radikalfänger oxidierend, dadurch ist eine langsame Bleichung möglich (Abb. 67).

SOD bewirkt den Sulfit-Abbau zu einem geringen Teil nicht-enzymatisch durch gebildetes H_2O_2 (Flockhart et al., 1971), stärker durch $POD-H_2O_2$:

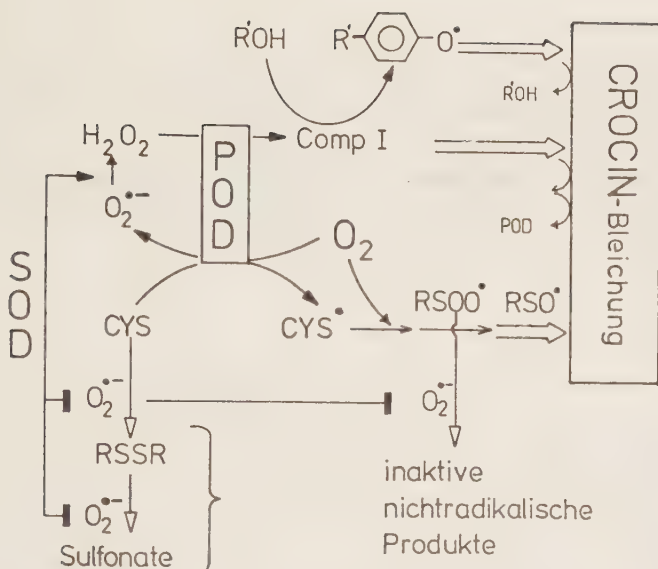
Die IAA $^{\cdot}$ -Abfangreaktion ist gehemmt ③, der Block ① aufgehoben. Der zusätzlich bleichende Comp.I wird möglich: die SOD-Wirkung beschleunigt damit den Pigmentabbau.

Mangan $^{2+}$, als oxidierbares "Substrat" der POD verzögert ebenfalls den Crocin-Abbau (Tab. 33).

Das System Mangan $^{2+}$ -POD ist auch bei pHAP-Anwesenheit nicht zur oxidativen Crocin-Bleichung fähig.

Bezüglich seiner SOD-Stimulierbarkeit nimmt CYSTEIN eine Sonderstellung ein: sowohl der CYS-Abbau durch POD als auch die Sauerstoffaufnahme durch POD-CYS, verstärkt durch pHAP, erfolgen mit steigender SOD-Aktivität beschleunigt. Ebenso ist die Pigmentbleichung SOD-stimuliert. Cystein-Autooxidation erfolgt metallkatalysiert (POD), dabei wird Sauerstoff reduziert (Misra, 1974).

Durch Dismutation (SOD) wird H_2O_2 gebildet, das mit POD zum Crocin-bleichenden Comp.I reagiert.



An dieser Stelle setzt die Verstärkerwirkung von pHAP ein. Sevilla et al. (1987) zeigten durch ESR, daß das Cystyl-Radikal $CYS^\bullet (=RS^\bullet)$ über das Peroxyl-Radikal nach Sauerstoffanlagerung zum sehr reaktiven Sulfinyl-Radikal ($RSO^\bullet$) und atomaren Sauerstoff weiterreagieren.

Wefers & Sies (1983) konnten das inaktive $RSSR$ als das Hauptprodukt des reaktionstreibenden RSH mit $O_2^{\bullet-}$ über HPLC nachweisen, ebenso die mögliche Weiterreaktion mit $O_2^{\bullet-}$ zu Sulfonaten.

Außerdem kann die reaktive Peroxyl-Radikalzwischenstufe durch Abfangreaktionen mit $O_2^{\bullet-}$ zu unreaktiven nichtradikalischen Produkten aus dem Crocin-Bleichungsmechanismus entfernt werden.

SOD kann somit als Regulator zwischen autokatalytisch produzierter H_2O_2 , das über Comp.I weiterreagiert und Superoxid-anion induzierter Abbau- und Abfangreaktion fungieren.

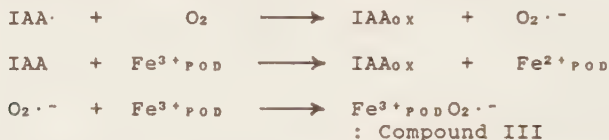
Harman et al. (1986) konnten bei L-Cystein in Abwesenheit von H_2O_2 in erheblich größerem Maße freie Thiol-Radikale über ESR detektieren, als beim entsprechenden GSH-HRP-Ansatz. Ihre Erklärung eines ausbleibenden SOD-Hemmeffekts mit eventueller POD-Aktivität einer Cu/Zn-SOD scheint durch die Sonderstellung der Wirkung auf CYS, gegenüber den anderen Thiolen nicht schlüssig.

Die Frage, warum obiger Mechanismus Cystein-spezifisch und nicht für GSH gilt, kann mit den einfachen Mitteln der Modellbiochemie nicht beantwortet werden.

III. IAA-Abbau

Die Möglichkeit des IAA-Abbaus durch Peroxidase ohne H_2O_2 unter Sauerstoffzehrung ist seit 1955 (Kenten) bekannt (Hinmann & Lang, 1965).

Der zunächst angenommene Peroxidase-Oxidase-Mechanismus (Yamazaki, 1963), der über die Bildung des freien IAA-Radikals zu Superoxidanion und anschließender Bildung von Compound III führen müßte, erwies sich als nicht richtig.



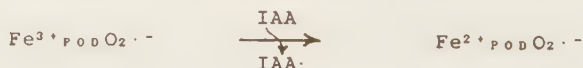
Die Ergebnisse in dieser Arbeit (Tab. 28) zeigen, daß SOD nicht zur Hemmung des IAA-Abbaus befähigt ist und somit auch nicht zur Comp.III-Bildung, wie z.B. bei Dihydroxyfumar-säure, beiträgt (Ricard & Job, 1973).

Ebensowenig ist H_2O_2 über Comp. I am Abbau beteiligt, da Katalase keinen Einfluß hat (Tab. 28). Bei dem im PAP-Test (Abb. 69) nachgewiesenen Peroxid handelt es sich vermutlich um Indolyl-Hydroperoxid, da dieses ebenso eine Farbstoff-Bildung verursachen kann (Vogl, 1987).

Die OH-Radikalfänger Mannit und Formiat sind ohne Wirkung (Tab. 28), was gegen eine Beteiligung von OH-Radikalen spricht.

Natriumascorbat und Propylgallat hemmen den Indol-3-essigsäure-Abbau vollständig, was die Beteiligung unspezifischer Radikale nahelegt.

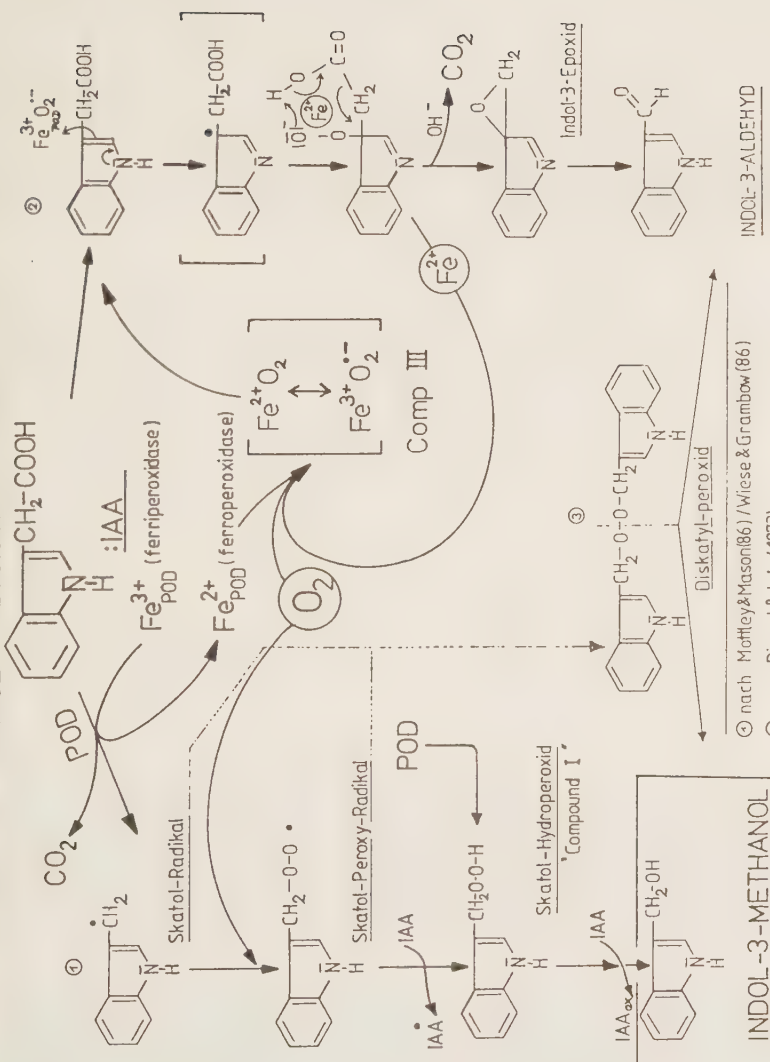
Die weitere Reduktion von Comp.III zum Comp.II erfolgt nur bei sehr hohen Substrat/Enzym-Verhältnissen



und hat 3-Methylenoxindol als Hauptprodukt zur Folge (Ricard & Job, 1973).

Das durch HPLC-Trennung isolierte und über Photo-Dioden-Array detektierte Hauptabbauprodukt konnte eindeutig als Indol-3-methanol identifiziert werden. Dieser Befund deckt sich gut mit Mottley & Mason (1986), die ein Skatyl-Radikal als Primärprodukt des IAA-Abbaus, anschließend durch POD, beobachteten.

MÖGLICHE ABBAU-WEGE VON INDOL-3-ESSIGSÄURE DURCH POD



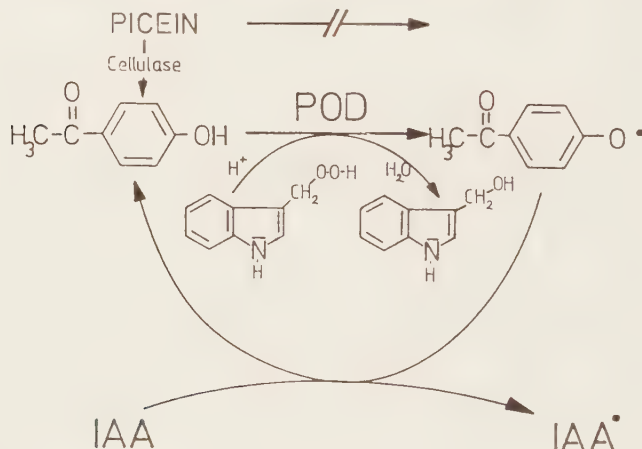
① nach Mottley & Mason (86) / Wiese & Grambow (86)

② • Ricard & Job (1973)

③ • BeMiller & Colilla (1972)

Das in weitaus geringerem Umfang anfallende 2. Produkt wurde als Indol-3-aldehyd bestimmt und läßt sich über einen durch Comp. III initiierten cyclischen Oxidationsprozess, wobei das Epoxid gebildet wird, erklären (Ricard & Job, 1973) .

Sowohl die Sauerstoffaufnahme während des IAA-Abbaus (Tab.21) als auch die direkte Quantifizierung von IAA (Abb.52-54) zeigte eine deutliche Säurekatalyse der Reaktion. Die Beschleunigung des Abbaus durch das Monophenol p-Hydroxyacetophenon wirkt sich ebenfalls auf O₂-Zehrung (Abb. 44) und die IAA-Konzentration (Abb. 55/Tab. 26) aus.



Die Abbaubeschleunigung ist von der pHAP Konzentration abhängig. Das Glucosid Picein wirkt nicht als Verstärker, erst das durch β -Glucosidase-Wirkung freigesetzte pHAP greift stimulierend in den Abbau ein (Abb. 56,57). Das sehr reaktive Alkoxyradikal ist für die erhöhte IAA-Oxidation verantwortlich. Durch den phenolisch-stimulierten Abbau verändert sich das Produktmuster nicht.

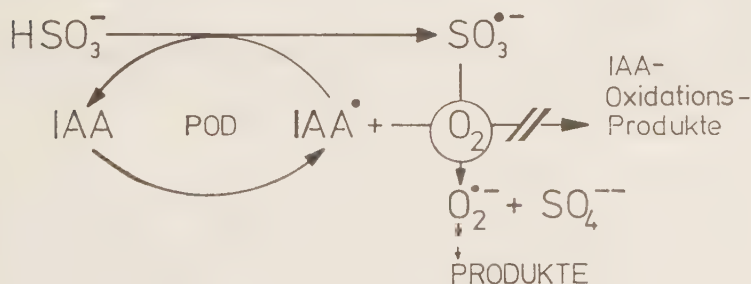
Das Phenol pHAP wird während der Reaktion nicht abgebaut. Während pHAP durch POD-H₂O₂ innerhalb von 30 Minuten verschwindet (Abb. 60), was an der gelb-bräunlichen Farbe eines polymeren Abbauproduktes erkennbar ist, wird im System POD-IAA durch H₂O₂-Zugabe das Phenol nicht abgebaut. Der Mechanismus der Reaktion verändert sich, da IM nur noch in geringer Konzentration vorliegt (Abb. 59). Es entstehen eine Reihe anderer Produkte, die noch nicht näher charakterisiert wurden. Der gesamte Abbau verlangsamt sich gegenüber der H₂O₂-freien Reaktion.

Das von Kenten (1955) als das eigentliche Oxidans bezeichnete Mn^{3+} entsteht durch POD aus Mangan $^{2+}$. Mn^{2+} -Ionen verzögern den Abbau, allerdings nicht in der phenolisch stimulierten Reaktion (Abb. 58).

Ebenso wie Mn^{2+} und H_2O_2 , verzögert auch Bisulfit den IAA-Abbau, doch erheblich deutlicher (Abb. 61).

Es handelt sich bei allen drei Verbindungen um reduzierte Substrate, die beim 1. Schritt der Peroxidase-Reaktion, der Reduktion der Ferro- zur Ferriperoxidase, mit dem eigentlichen Substrat IAA konkurrieren und dadurch den Abbau verzögern.

Die Sauerstoffaufnahme durch POD-IAA wird durch HSO_3^- -Zugabe deutlich verstärkt, wobei POD- HSO_3^- nur geringen Sauerstoffverbrauch zeigt; trotzdem ist der IAA-Abbau stark gehemmt (Tab. 29).



Durch HSO_3^- -„Peroxidation“ wird $HSO_3^{\bullet-}$ gebildet (Mason, 1983) und dabei Sauerstoff reduziert; für die IAA-Oxidation steht er somit nicht mehr zur Verfügung. Der hohe Sauerstoffverbrauch wird durch IAA katalysiert, Sulfid ist das eigentliche Substrat in dieser Reaktion.

Dieser Befund deckt sich mit der Feststellung von Fox et al., (1965) daß Bisulfit als Fänger von freien Radikalen mit IAA reagiert, wobei sich die meßbare IAA-Konzentration zunächst nicht ändert.

Nach peroxidativem Sulfitabbau und ausreichender Sauerstoffsättigung beginnt anschließend der Abbau der Indol-3-essigsäure.

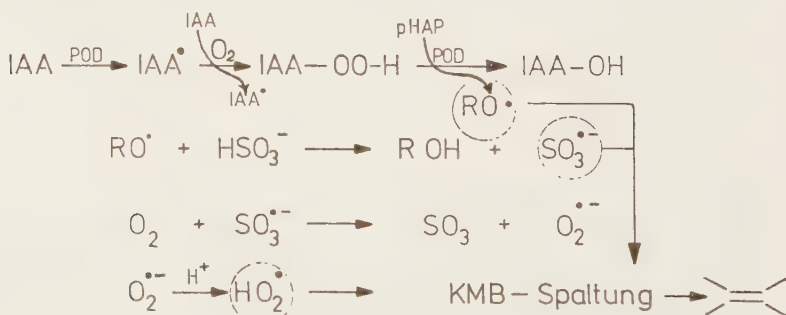
IV. Ethylenbildung

Die Spaltung von ACC erfolgt durch POD und Mn^{2+} in Anwesenheit des Phenols pHAP. Durch IAA kann pHAP ersetzt werden. Mangan $^{2+}$ ist zur Ethylenbildung unbedingt erforderlich; POD und H_2O_2 sind nicht in der Lage ACC zu spalten.

Der peroxidative ACC-Abbau durch IAA ist im Sauren deutlich begünstigt, die hinzukommende Verstärkerwirkung von pHAP kommt allerdings im Alkalischen stärker zum Tragen (Abb.71).

Beim IAA-Abbau durch POD wurde gezeigt, daß Bisulfit hemmend wirkt. Ebenso wird die ACC-Oxidation durch IAA und POD- Mn^{2+} von HSO_3^- erheblich abgesenkt (Abb. 77), geringer bei pHAP-Anwesenheit, was die Radikalfängereigenschaft von Bisulfit bestätigt. Gleichzeitig wird klar, daß das Indolylradikal, bzw. Alkoxyradikal zwar am ethylenbildenden Prozess beteiligt ist, die "grundsätzliche Radikaleigenschaft" aber nicht ausreichend ist, da das reaktive $HSO_3^{\cdot-}$ Radikal nicht zur ACC-Spaltung befähigt ist.

Die ACC-Spaltung durch das System POD- Mn^{2+} -pHAP ist nur geringfügig SOD-hemmbar (10 %), die KMB-Spaltung dagegen vollständig (Abb. 24/26).



Nach weiterer HSO_3^- -Zugabe ist das System nicht mehr SOD-hemmbar. Einerseits konkurriert HSO_3^- mit dem $\text{IAA}^{\cdot}$ und verzögert dadurch seinen Abbau, andererseits wird durch das dabei entstehende Alkoxyradikal gleichzeitig die von Mapson & Wardale (1971) vorgeschlagenen Radiakalkette über HSO_3^- eingeleitet, die über $\text{O}_2^{\cdot-}$ und Folgeprodukte KMB-Spaltung ermöglicht, aber keine ACC-Spaltung.

Die KMB-Spaltung über diesen Mechanismus ist nicht SOD-hemmbar und von Mangan unabhängig und steht der metallkatalysierten ACC-Spaltung gegenüber (Abb. 82).

SOD und KAT wirken nicht hemmend auf die ACC-Oxidation durch POD-Mn⁺⁺-IAA (Abb. 79) wie auch schon beim IAA-Abbau, so daß Superoxidanion und H₂O₂ nicht direkt an der ACC-Spaltung beteiligt sein dürften.

Auch ein OH-Radikal kann durch die Wirkungslosigkeit von Formiat und Mannit (Abb. 80) ausgeschlossen werden.

Die "allgemeinen" Radikalfänger Propylgallat und Ascorbat hemmen die Reaktion vollständig, so daß auch hierdurch wieder Hinweise auf Radikalbeteiligung bestehen (Abb. 81).

Das scharfe [Mn⁺⁺]-Optimum in einem erheblich geringeren Konzentrationsbereich (50 µM) als die der Partner, spricht für eine Beteiligung von katalytischen Mangan-Mengen am ethylenbildenden Schritt.

Das Glucosid Picein beeinflusst die ACC-Spaltung nicht; erst durch die Aktivität einer Cellulase wird in deutlichem Maße Ethylen freigesetzt (Abb. 78).

Von den IAA-Abbauprodukten ist nur IM, allerdings abgeschwächt zur Ethylenbildung befähigt, so daß entgegen früheren Arbeiten (Frenkel, 1975) nicht die Produkte, sondern IAA selbst die Ethylenbildung treibt.

Bis zu einem bestimmten Maße können diese Modellsysteme mit denen von Shimokawa (1983) und Vioque et al. (1981) verglichen werden. Sie extrahierten eine ACC-Oxidase, die allerdings neben Mn⁺⁺ und Dichlorphenol auch Pyridoxalphosphat erforderte, da erst über die Schiff'sche Base stabilisiert, eine ACC-Oxidation möglich war; die in dieser Arbeit eingesetzte HRP war ohne PyP dazu in der Lage.

Rohwer & Mäder (1981) fanden neben aktiven ACC-Oxidaseuntereinheiten eine POD, die aber keine Ethylenbildung zeigt: ihr System enthielt allerdings kein Phenol!

Guy und Kende (1984) beobachteten, daß aus Protoplasten isolierte Vakuolen zur Ethylenproduktion fähig sind. Sie nahmen an, daß ACC aus dem Cytoplasma in die Vakuole transportiert wird, wo die Oxidation stattfindet.

Durch die Anwesenheit von Phenolen, Indol-essigsäure (Driss-Ecole & Perbal, 1987) und POD (Grob & Matile, 1980)/Schloß et al., 1987) ist der Schluß berechtigt, daß in der Vakuole alle Voraussetzungen zur Ethylensynthese bestehen, wie sie durch diese Modelluntersuchungen simuliert worden sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Modelle sollen dazu beitragen, Einzelbeobachtungen in vivo, auch unter Berücksichtigung der Auswirkungen von Schadeinflüssen auf einen der vier Komplexe verstehen und koordinieren zu können.

ZUSAMMENFASSUNG

p-Hydroxyacetophenon

Das schon länger bekannte p-Hydroxyacetophenon wurde aus Fichtennadeln isoliert und mit chemischen und spektroskopischen Methoden charakterisiert.

Die Verbindung zeigt fungitoxische Eigenschaften gegenüber Cladosporium cucumerinum sowie dem Forstpathogen Rhizosphaera kalkhoffii bubak.

Die in der Nadel vorliegende Konzentration übertrifft um ein Mehrfaches die zur Hemmung notwendigen Menge.

Das Aglucon ist stets mit seinem Glucosid Picein, dessen Gehalt erheblich höher ist, vergesellschaftet; ihre Summe ist aber konstant.

Picein hat keinen Einfluß auf das Pilzwachstum.

Ozonbelastung führt zur Abnahme der Konzentration von p-Hydroxyacetophenon.

Seneszenz-Modellreaktionen

Die Sulfhydrylgruppe des L-Cysteins spielt eine bedeutende Rolle für Struktur und Funktion von Proteinen. Eingriffe sind meist mit einer Oxidation der Thiol-Gruppe verbunden.

Die Autoxidation der Thiol-Gruppe kann durch Peroxidase um ein Vielfaches beschleunigt werden. Neben L-Cystein wurde der Abbau von Glutathion und dem toxischen Bisulfit durch Peroxidase, aber ohne exogenes H_2O_2 , unter dem Blickwinkel der Verknüpfung mit dem Sauerstoff-Metabolismus untersucht.

Der Thiol-Abbau unter Sauerstoff-Verbrauch läuft über Thiylradikale, die das wasserlösliche Carotinoid Crocin, ein Polyen, oxidativ bleichen.

Das Phenol p-Hydroxyacetophenon wirkt sowohl auf Bleichung als auch auf den Thiol-Abbau verstärkend.

Superoxid-Dismutase zeigt gegenüber dem Cystein-Abbau eine ungewöhnliche, stimulierende Rolle.

Das Auxin Indolelessigsäure wird ebenso durch Peroxidase unter Sauerstoff-Verbrauch abgebaut. Als Abbauprodukt wurde Indolmethanol und in geringem Maße Indolaldehyd gemessen. Die reaktiven Zwischenprodukte, verstärkt durch das Phenol gebildet, sind zum Crocin-Abbau befähigt.

Charakterisierung der PEROXIDASE Systeme

pH=7,8 / 10U POD		Ethylen — Bildung		
System 0,5 mM	+pHAP 0,5 mM	p.mol KMB 2,5 mM	BLEICHUNG CROCHN	pmol ACC 2,5 mM
H ₂ O ₂	— +	402 1 833		0 32
GSH	— +	28 321		0 0
CYS	— +	43 127		0 0
HSO ₃ ⁻	— +	720 1 057		67 114
IAA	— +	335 420		0 0
Mn ²⁺ 50 μM	— +	695 3 029		323 3 276
IAA + Mn ²⁺ 50 μM	— +	441 845		935 5 665

Aminocyclopropan-carbonsäure wird durch Peroxidase und Mangan²⁺ in Anwesenheit von Indolelessigsäure oder p-Hydroxyacetophenon gespalten.

Die im sauren Milieu deutlich bevorzugte Reaktion ist sowohl von der Indolelessigsäure-, als auch von der Phenol-Konzentration abhängig.

Mangan²⁺ wird dagegen nur in katalytischen Mengen benötigt und zeigt ein scharfes Konzentrationsoptimum.

In geringem Maße ist das Hauptabbauprodukt des Auxins, Indol-methanol, zur Ethylenbildung befähigt.

Hemmstoffe gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxidation, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal, bleiben auf diese oxidative Ethylenfreisetzung ohne Wirkung.

Die universellen Radikalfänger Propylgallat und Ascorbat hemmen vollständig.

Bisulfit fungiert einerseits als Substrat der Peroxidase bei der Crocin-Bleichung, andererseits wird die Ethylenfreisetzung durch Peroxidase, Indolelessigsäure und Mangan²⁺ durch den Radikal-Scavenger HSO₃ drastisch abgesenkt.

Mangan²⁺ und Peroxidase sind allein nicht zur Sauerstoff-Reduktion fähig; ebenso zeigt die Zugabe von p-Hydroxyacetophenon keinen Effekt.

Erst die Anwesenheit von Aminocyclopropan-carbonsäure bedingt Sauerstoff-Zehrung; der Indikator für reaktive Sauerstoff-Spezies α -Ketomethylbuttersäure hat dagegen keinen Einfluß.

Zur Ein-Elektronenübertragung auf den Sauerstoff ist vermutlich der ACC-Ring mit einer Komplexierung des Mangans beim Valenzwechsel, vermittelt durch ebenfalls komplexierende Peroxidase, erforderlich.

Zwei getrennt ablaufende Modellreaktionen sind zur Sauerstoffaufnahme befähigt:

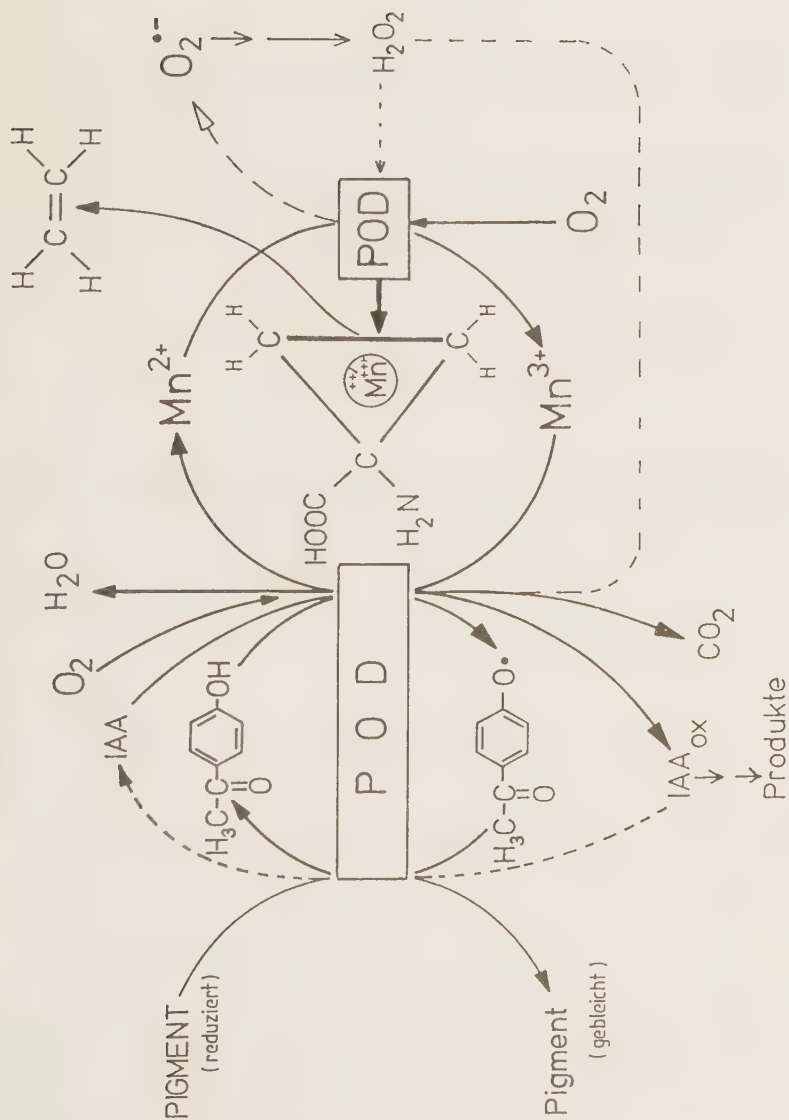
- Indolyldradikale, durch direkte Peroxidasewirkung entstanden, nehmen Sauerstoff direkt oder über Compound III auf und werden dadurch zu oxidierten Produkten abgebaut.
- Aminocyclopropan-carbonsäure und vermutlich auch Peroxidase komplexieren Mangan. Nach Stabilisierung ist die Oxidation durch Compound I und gleichzeitige Reduktion des Sauerstoffs denkbar.

Im folgenden die Zusammenstellung der für die einzelnen Modellreaktionen unbedingt erforderlichen Komponenten:

Indolelessigsäureabbau	POD + O ₂
Crocinbleichung	POD + O ₂ + IAA
Ethylenbildung aus ACC	POD + O ₂ + IAA + Mn ²⁺

Für keinen Einzelaspekt ist exogenes Wasserstoffperoxid notwendig. Peroxidase ist zum einen wasserstoffperoxidunabhängig zum Indolelessigsäureabbau befähigt, zum anderen auch in der Lage, den Elektronenakzeptor Wasserstoffperoxid selbst zu produzieren, sei es durch Autoxidation von Thiolen oder Oxidation von Mangan in Anwesenheit von Monophenolen.

SENESZENZ – MODELL



Die in dieser Arbeit getrennt dargestellten Peroxidase-Prozesse lassen sich in einer Kausalkette anordnen:

- Polyen- und Thiol-Oxidation als Modell für entstehende Membranschäden und Dekompartimentierung
- Abbau des "Resistenzfaktors" Indolelessigsäure
- Pigmentbleichung
- Produktion des Seneszenzhormons Ethylen

Somit läßt sich der durch Kopplung mit oxidativen Schritten reduktiv aktivierte Sauerstoff an die Verknüpfungsstelle des anfänglich gezeigten Schemas (S.5) setzen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABELES, F.B.
Ethylene in Plant Biology.
Academic Press, New York (1973)
2. ADAMS, D.O. & S.F. YANG
Ethylene biosynthesis: Identification of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA 76, 170-174 (1979)
3. ARTISS, J.D., THIBERT, R.J., J.M. MC INTOSH & B. ZAK
Study of various substrates for Peroxidase-coupled Peroxidase-Oxidations.
Microchem. 26, 487-505 (1981)
4. ASADA, K. & K.KISO
Initiation of aerobic oxidation of sulfit by illuminated Spinach chloroplasts.
Eur. J. Biochem., 33, 253-257 (1973)
5. AUST, S.D., L.A. MOREHOUSE & C.E. THOMAS
Role of metals in Oxygen Radical Reactions
Journal of Free Radicals in Biology & Medicine.
1, 3-25 (1985)
6. BAILEY, J.A.
Phytoalexins, Vol.1 (1982) Blackie, Glasgow and London
7. BE MILLER, J.N. & W. COLILLA
Mechanism of corn Indol-3-acetic acid oxidase in vitro.
Phytochemistry, 11, 33, 3-3402 (1972)
8. BOLLER, T & H. KENDE
Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells.
Plant Physiol., 63, 1123-1132 (1979)
9. BOLLER, T & H. KENDE
Regulation of wound ethylen synthesis in plants.
Nature, 286, 259-260 (1980)
10. BROWN, B.H., A. CROZIER & G. SANDBERG
Catabolism of Indol-3-acetic acid in chloroplast fractions from light-grown Pisum sativum seedlings.
Plant Cell and Environment 9, 527-534 (1986)
11. BORS, W., C. MICHEL & M. SARAN
Inhibition of the bleaching of the carotenoid Crocin; a rapid test for quantifying antioxidant activity.
Biochimica et Biophysica Acta, 796, 312-319 (1984)

12. BORS, W., M. SARAN & A. CZAPSKI
The nature of intermediates during biological oxygen activation.
In: Biological and Clinical Aspects of Superoxide and SOD (W.H. Bannister and J.V. Bannister, eds)
1-31, Elsevier/North Holland, New York (1980)
13. CHAPPELL, J., K. HAHLBROCK & T. BOLLER
Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia lyase.
Planta 161, 475-480 (1984)
14. COHEN, H.J. AND J. FRIDOVICH
Hepatic sulfiteoxidase. The nature and function of the heme prosthetic groups.
J. Biol. Chem. 246, 359-366 (1971)
15. MCCORD, J.M. AND FRIDOVICH, J.
The utility of SOD in studying free radical reactions.
J. Bact. Chem. 22, 6065-6063 (1969)
16. DITTRICH, P.
Untersuchungen über den Umsatz sekundärer Pflanzenstoffe in den Nadeln von *Picea abies* k.
Dissertation, Univ. München (1970)
17. DORDICK, J.S., A.M. KLIBANOV & M.A. MARLETTA
Horseradish Peroxidase Catalyzed Hydroxylations: Mechanistic Studies.
Biochemistry, 25, 2946 (1986)
18. DRISS-ECOLE, D. & G. PERBAL
Intracellular localisation of ^3H -IAA in the apical bud of *Lycopersicon esculentum*.
J. of Experimental Botany, 38 (1993), 1362-1372 (1987)
19. ELLMANN, G.L.
Tissue sulfhydryl groups
Arch. Biochem. Biophys., 82, 70 (1959)
20. ELSTNER, E.F.
Oxygen activation and oxygen toxicity
Ann. Rev. Plant Physiol., 33, 73-96 (1982)
21. ELSTNER, E.F.
Der "aktivierte" Sauerstoff
Med.Welt, 35, 728-735 (1984)
22. ELSTNER, E.F. & A. HEUPEL
Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from Horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.)
Planta, 130, 175-180 (1976)

23. ELSTNER, E.F. & W.F. OSSWALD
Chlorophyll photobleaching and ethane production in
Dichlorophenyldimethylurea (DCMU) or Paraquat-treated
Euglena gracilis cells.
Z. Naturforsch. 35c, 129-135 (1980)
24. ELSTNER, E.F., W.SCHÖTZ & G. VOGEL
Modellreaktionen zur Asbesttoxikologie
Elstner, E.F., Bors, W. und Wilmanns, W. (Hrsg.)
in: *Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin*
Springer Verlag (1986)
25. ELSTNER, E.F. & R. YOUNGMAN
Oxygen activation in chloroplasts: Models for in vivo
observations.
Ber. Deutsch. Bot. Ges., Bd. 91, 567-577 (1978)
26. ERNSTSEN, A., G. SANDBERG, A. CROZIER & C.T. WHEELER
Endogenous indols and the biosynthesis and metabolism of
indol-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*.
Planta 171, 422-428 (1987 b)
27. ERNSTSEN, A., G. SANDBERG & K. LUNDSTRÖM
Identification of oxindol-3-acetic acid, and metabolic
conversion of indol-3-acetic acid to oxindol-3-acetic acid
in *Pinus silvestris* seeds.
Planta 171, 47-52 (1987)
28. ESTERBAUER, H., D. GRILL & G. BECK
Untersuchungen über Phenole in Nadeln von *Picea abies*.
Phyton (Austria) 17, 87-99 (1975)
29. FENTON, H.J.H.
Oxidation of tostaric acid in the presence of iron.
J. Chem. Soc. 65, 899-910 (1894)
30. FLOCKHART, B.D., K.J. IVIN, R.C. PINK & B.D. SHARMA
The nature of thiylradical intermediates in the reactions
between hydroperoxides and sulfurdioxide and their
alkene derivatives: elektron spin resonance study.
Chem. Commun. 339-340 (1971)
31. FOX, L.R., W.K. PURVES & H.J. NAKADA
Biochemistry 4, 2754-2763 (1965)
32. FRANICH, J.A., P.D. GADFIL & L. SHAIN
Physiol. Plant Pathol. 23, 183-195 (1983)
33. FRENKEL, C. & R. DYCK
Auxin inhibition of ripening in Bartlett Pears.
Plant Physiol 51, 6-9 (1973)

34. FRENKEL, C.
Oxidative turnover of auxins in relation to the outset of ripening in Bartlett Pears.
Plant Physiol. 55, 480-484 (1975)
35. FRIEND, J. & A.M. MAYER
The enzymatic destruction of carotinoids by isolated chloroplasts.
Biochem. et Biophys. 41, 422 (1960)
36. GLENN, J.K., L. AKILESWARAN & M.H. GOLD
Mn(II)-Oxidation is the function of the extracellular Mn-Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*.
Arch. Biochem. Biophys. 234, 353-362 (1986)
37. GOLDTWAITE, J.J. & W.J. LAETSCH
Regulation of senescence in bean leaf discs by light and chemical growth regulators.
Plant Physiol. 42, 1757-1762 (1967)
38. GRAMBOW, H.J. & B. LANGENBECK-SCHWICH
The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide and phenolic compounds in the degradation of indol-3-acetic acid in vitro.
Planta 157, 131-137 (1983)
39. GROB, K. & PH. MATILE
Compost mentation of ascorbic acid in vacuoles of horse-radish root cells. Note on vacuolar Peroxidase.
Z. Pflanzenphysiol., 98, 235-243 (1980)
40. GUY, M. & H. KENDE
Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L.
Panta, 160, 281-287 (1984)
41. HALLIWELL, B. & J. DE RYCKER
Superoxid and Peroxidase-catalysed reactions. Oxidation of Dihydroxyfumarate NADH and Dithiothreitol by Horse-radish Peroxidase.
Photochemistry and Photobiology 28, 757-763 (1978)
42. HARMAN, L.S., D.K. CARVER, J. SCHREIBER & R.P. MASON
One and two-elektron oxidation of reduced Glutathion by Peroxidases.
J. Biol. Chem. 261(4), 1642-1648 (1986)
43. HARMAN, L.S., C. MOTTLEY & R.P. MASON
Free radical metabolites in L-Cysteine oxidation.
J. Biol. Chem. 259, 5606-5611 (1984)

44. HARTMAN, G. & T. NIENHAUS
The isolation of Xanthoxylin from the bark of *Phytophthora* and *Hendersonula*-infected citrus limon and its fungitoxic effect.
Phytopath. Z. 81, 97-113 (1974)
45. HAYON, E. A. TREININ & L.G. WILSON
Electronic spectra, photochemistry and autoxidation mechnism of the sulfit-, bisulfit-, pyrosulfit-systems. The SO_2 , SO_3 , SO_4 , SO_5 -radicals.
J. Am. Chem. Soc. 94, 47-57 (1972)
46. HEGNAUER, R.
Chemotaxonomie der Pflanzen.
B.I/IV Basel-Stuttgart (1962)
47. HINMAN, R.L. & J. LANG
Peroxidase catalyzed oxidation of Indol-3-acetic acid
Biochemistry 4, 144-158 (1965)
48. HOLLEMANN-WIBERG
Lehrbuch der Anorganischen Chemie.
Walter de Gruyter - Berlin - New York, 91.-100.Aufl.(1985)
49. HOMANS, A.L. & S. FUCHS
J. Chromatogr. 51, 327 (1970)
50. HOQUE, E.
Norway Spruce dieback: Occurence, isolation and biological activity of p-Hydroxyacetophenon and pHAP-O-Glucosid and their possible roles during stress phenomena.
Eur. J. For. Path. 15, 129-145 (1985)
51. HUFF, A.
Peroxidase-catalysed oxidation of chlorophyll by hydrogen peroxide.
Phytochem. 21.2, 261-265 (1982)
52. HURNG, W.P., L.Y. SU & C.H. KAO
Senescence of rice leaves XVI. Regulation by Light.
Bot. Bull. Academia Sinia, 27, 163-174 (1986)
53. HYODO, H., K. TANAKA & K. WATANABE
Wound induced ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in mesocarp tissue of winter squash fruit.
Plant Cell Physiol. 24, 963-969 (1983)
54. KANNER, H. & S.HAREL
Initiation of membranal lipid peroxidation by activated Metmyoglobin and Methemoglobin.
Arch. Biochem. Biophys. 237 (2), 314-321 (1985)

55. KATO, M. & S.SHIMIZU
Chlorophyll metabolism in higher plants VI. Involvement
of peroxidase in chlorophyll degradation.
Plant Cell Physiol. 26, 7, 1291-1301 (1985)
56. KENTEN, P.H. & P.J.G. MANN
The oxidation of certain dicarboxylic acids by
Peroxidase-Systems in presence of Manganese.
Biochem.J., 53, 498-505 (1953)
57. KENTEN, R.H.
Biochem. J. 59, 110-121 (1955)
58. KENTEN, R.H. & P.J.G. MANN
Manganese oxidation in the Pea plant grown under conditions
of Manganese toxicity.
Biochem. J. 57, 179-185 (1957)
59. KONZE, J.R. & H. KENDE
Ethylene formation from 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic
acid in homogenates of etiolated pea seedlings.
Planta 146, 293-301, (1979)
60. KONZE, J.R. & G.M.K. KWIATKOWSKI
Rapidly induced ethylene formation after wounding is
controlled by the regulation of 1-aminocyclopropane-1-
carboxylic acid synthesis.
Planta, 151, 327-330 (1981)
61. KREBS, H.A.
Biochem. J. 36, 303 (1942)
62. KUROKI, M., Y. SHIOI & T. SASA
Purification and properties of soluble chlorophyllase from
tea leaf sprouts.
Plant Cell Physiol. 22, 717-725 (1981)
63. LAL, M.
Radiolytic oxidation of cystein in aerated and oxygen
saturated solutions.
Radiat. Phys. Chem. 19, 427-434 (1982)
64. LIZADA, M.C. & S.F. YANG
Sulfit induced lipid peroxidation
Lipids 15, 89-104 (1981)
65. LÜRSSEN, K., K. NAUMANN & R. SCHRODER
1-Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid - an intermediate
of the ethylene biosynthesis in higher plants.
Z. Pflanzenphysiol. 92, 285-294 (1979)
66. MANN, T. & D.KEILIN
Proc.Roy.Soc.Ser.B.Biol.Sci. 126, 303 (1939)

67. MAGNUS, V., S. ISKRIC & S. KVEDER
Indol-3-methanol, a metabolite of IAA in Pea seedlings
Planta 97, 116-125 (1971)
68. MAGNUS, V., S. SIMAGA, S. ISKRIC & S. KVEDER
Metabolism of Tryptophan, Indole-3-acetic acid and related
compounds in parasitic plants from the genus *Orobanchae*.
Plant Physiol., 69, 853-858 (1982)
69. MAPSON, L.W. & D.A. WARDALE
Role of Indole-3-acetic acid in the formation of ethylene
from 4-Methylmercapto-2-oxo-butyric acid by Peroxidase.
Phytochem. 11, 1371-1387 (1972)
70. MARTINOIA, E., M.J. CALLING & PH. MATILE
Catabolism of chlorophyll: Demonstration of chloroplast-
localized peroxidative and oxidative activities.
Z. Pflanzenphysiol. 107, 269-279 (1982)
71. MASON, H.S., J. ONOPRYENKO & D. BUHLER
Biochim. et biophys. acta 24, 225 (1957)
72. MASON, R.P. & C.F. CHIGNELL
Free Radicals in pharmacology and toxicology,
selected topics.
Pharmacol. Rev. 33, 189-210 (1982)
73. MASON, R.P., C.F. CHIGNELL, T.E. ELING & C. MOTTLEY
Free radical formation during the peroxidase-catalysed
oxidation of (bi)sulfite.
Life Chem. Rep. Supp. 2, 55-63 (1983)
74. MATILE, PH.
Catabolism of Chlorophyll: Involvement of peroxidase.
Z. Pflanzenphysiol. 99, 475-478 (1980b)
75. MEUDT, W.J. & K.T. STECHER
Promotion of peroxidase activity in the cell wall of
Nicotiana tabacum.
Plant Physiol., 46, 510-512 (1972)
76. MISRA, H.P.
Generation of superoxide free radical during autoxidation
of thiols.
J. Biol. Chem. 249, 2151-2155 (1974)
77. MONTALBINI, P. & E.F. ELSTNER
Ethylene evolution by rust-infected, detached bean
(*Phaseoli vulgaris* L.) leaves susceptible and hypersen-
sitive to *Uromyces phaseoli*.
Planta 135, 301-306 (1977)

78. MOTTLEY, C & R. MASON
An electron spin resonance study of free radical intermediates in the oxidation of Indol-acetic-acid by Horseradish Peroxidase.
J. Biol. Chem. 261/36, 16860-16864 (1986)
79. MOTTLEY, C. T.B. TRICE & R.P. MASON
Direct detection of the sulfur trioxid radical anion during the Horseradish Peroxidase-Hydrogen Peroxide oxidation of sulfite.
Molecular Pharmacology, 22, 732-737 (1982)
80. NAKAMURA, S.
Initiation of sulfite oxidation by spinach ferredoxin-NADP-reductase and ferredoxin system: a model experiment on the superoxide anion radical production by metalloflavo-proteins
Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 177-183 (1970)
81. NIEMANN, G.J.
Some aspects of the chemistry of Pinaceae Needles.
Acta Bot. Neerl., 28, 73-88 (1979)
82. OSSWALD, W.F. & E.F. ELSTNER
Investigations on Spruce Decline in the Bavarian Forest.
Free Rad. Res. Comms., Vol. 3, No. 1-5, 185-192 (1986)
83. OSSWALD, W.F. & E.F. ELSTNER
Fichtenerkrankungen in den Hochlagen der bayr. Mittelgebirge.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 99, 313-339 (1986)
84. OSSWALD, W.F. & E.F. ELSTNER
Mechanismen der pathologischen Pigmentbleichung bei Pflanzen.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 99, 341-365 (1986)
85. OSSWALD, E.F., H. HEINISCH & E.F. ELSTNER
Einfluß von Mineralstoffernährung, Ozon und saurem Nebel auf den Gehalt der fungitoxischen Substanz p-Hydroxyacetophenon in Fichtennadeln.
Forstw. Cbl. 105, 261-264 (1986)
86. OSSWALD, W.F., W. SCHÜTZ & E.F. ELSTNER
Indol-3-acetic acid oxidation and Crocin-Bleaching by Horseradish Peroxidase.
Plant Physiol. in press (1987)
87. OSSWALD, W.F., S. ZIEBOLL, W. SCHÜTZ, J. FIRL & E.F. ELSTNER
p-Hydroxyacetophenon a fungitoxic compound in spruce needles.
In press (1987)

88. OVEREEM, J.L. in:
Biochemical aspects of Plant-Parasit relationships
(Friend, J. and D.R. Threlfall, eds.)
Academic Press, New York 195-206 (1976)
89. PEISER, G.D. & S.T. YANG
Sulfite-mediated destruction of β -carotene.
Agric. Food Chem. 27, 446-449 (1979)
90. REED, A.G., J.F. CURTIS, C.MOTTLEY, T.E. ELING &
R.P.MASON
Epoxidation of ($\pm$)-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a) pyrene
during (bi)sulfite antioxidation: Activation of a
procarcinogen by a cocarcinogen.
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 7499-7502 (1986)
91. REINECKE, D.M. & R.S. BANDURSKI
Oxindol-3-acetic acid, an Indol-3-acetic acid metabolite
in Zea mays.
Plant Physiol. 71, 211-213 (1983)
92. RICARD, J., MAZZA, G. & R.J.P. WILLIAMS
Eur. J. Biochem. 28, 566-578 (1972)
93. RICARD, J. & D.JOB
Reaction mechanisms of Indol-3-acetate degradation by
Peroxidases
Eur.J.Biochem. 44, 359-374 (1974)
94. RIDGE, J. & D.J. OSBORNE
Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of Pisum
sativum: Regulation by ethylene.
Journal of Experimental Botany, 21, 843-856 (1979)
95. ROHWER, F. & M. MÄDER
The role of peroxidase in ethylene formation from 1-amino-
cyclo-propane-1-carboxylic acid.
Z. Pflanzenphysiol. 104, 363-372 (1981)
96. ROTILIO, G., G. FALCIONI, E. FIORETTI & M. BRUNAI
Biochem., J. 145, 405-407 (1975)
97. ROYLE, D.J. in:
Biochemical aspects of Plant-Parasite relationships.
(Friend, J. and D.R. Threlfall, eds.) pp. 161-193 (1976)
Academic Press, New York
98. SABATER, F., M. ACOSTA, J. SANCHEZ-BRAVO, J. CUELLO &
J.A. DEL RIO:
Indol-3-methanol as an intermediate in the oxidation of IAA
by peroxidase.
Physiol. Plant 57, 75-78 (1983)

99. SAWADA, Y & I. YAMASAKI
Biochim. Biophys. Acta, 327, 257-265 (1973)
100. SCHLOß, P., C. WALTER & M. MÄDER
Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L.
Planta 170, 225-229 (1987)
101. SCHMIDT, W.
Z. Wirtsch. gruppe Zuckerind., 85, 200 (1935)
102. SCHNEIDER, E.A. & F. WIGHTMAN
Metabolism of auxin in higher plants.
Annual Review of Plant Physiology, 25, 487-513 (1974)
103. SCHÖNBECK, F. & E. SCHLÖSSER, in:
Physiological Plant Pathology
(Heitefuß, R. and P.H. Williams, eds) pp. 653-678 (1976)
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
104. SEDEWITZ, B., K.H. SCHLEIFER & F. GÖTZ
Purification and Biochemical characterisation of Pyruvate
Oxidase from *Lactobacillus plantarum*.
J. Bacteriol. 160(1), 273-278 (1984)
105. SEVILLA, M.D., D. BECKER, S. STWARDS & J. HERRINGTON
Sulfinyl Radical formation from the reaction of Cysteine
and Glutathion thiol Radicals with Molecular Oxygen.
Biochem. Biophys. Res. Com. 144(2), 1037-1042 (1987)
106. SHIMAZAKI, K
Sulfit inhibition of photosystem II in illuminated
spinach leaves.
Plant and Cell Physiol. 25, 337-341 (1984)
107. SHIMAZAKI, K., SAKAKI, T., KONDO, N. & SUGAHARA, K.
Plant and Cell Physiol. 21, 1193-1204 (1980)
108. SHIMOKAWA, K.
An ethylene-forming enzyme in citrus unshiu fruits.
Phytochemistry 22/9, 1903-1908 (1983)
109. STAFFORD, H.A.
The metabolism of aromatic compounds
Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 459-486 (1974)
110. STUTZ, R.E.
Enzymatic formation of Indol-3-carboxaldehyd from IAA
Plant Physiol., 33, 207-212 (1958)
111. SUNDBERG, B., G. SANDBERG & E. JENSEN
Identification and quantification of Indol-3-methanol in
etiolated seedlings of Scots pine.
Plant Physiol. 77, 952-955 (1985)

112. SUNDBERG ,B., G. SANDBERG & E. JENSEN
Catabolism of IAA to IM in a crude enzyme extract and in
protoplasts from Scots pine.
Physiologia Plantarum 64, 438-444 (1985 b)
113. TREBST, A.
Z. Naturforsch., 19 b, 418 (1974)
114. VIOQUE, A., A. ALBI & B. VIOQUE
Role of IAA-Oxidase in the formation of Ethylene from
1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid.
Phytochemistry 20 (7), 1473-1475 (1981)
115. VOGL, G.
Dissertation,
Technische Universität München (1987)
116. WALDRUM, J.D. & E. DAVIS
Subcellular localisation of IAA-Oxidase in peas.
Plant Physiol. 68, 1303-1307 (1981)
117. WEBER, F. & W. GROSCH
Co-oxidation of a carotinoid by the enzym lipooxygenase.
Z. Lebensm. unters. u. Forsch., 161, 223 (1976)
118. WEFERS, H. & H. SIES
Oxidation of glutathion by the superoxide radical to the
disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen.
Eur. J. Biochem., 137, 29-36 (1983)
119. WEFERS, H., E. RIECHMANN & H. SIES
Excited species generation in Horseradish Peroxidase
mediated oxidation of Glutathion.
J. Free Rad. Biol. & Med., 1, 311-318 (1985)
120. WIESE, G. & H.J. GRAMBOW
Content and metabolism of Indole-3-acetic acid in healthy
and Rust-Infected Wheat leaf segments.
Z. Naturforsch., 41 c, 1023-1031 (1986)
121. WIESE, G. & H.J. GRAMBOW
Indol-3-methanol β -D-Glucoside and Indole-3-carboxylic-
acid- β -D-Glucoside are products of Indole-3-acetic acid
degradation in Wheat leaf segments.
Phytochemistry 25,11, 2451-2455 (1986 b)
122. WIGHTMORE, F.W.
Effect of indoleacetic acid and hydroxyproline on
isoenzymes of Peroxidases in Wheat coleoptiles.
Plant Physiology, 47, 169-171 (1971)
123. WOODS, A.F.
The destruction of chlorophyll by oxidizing enzymes.
Centralblatt Bakt., Paras., Infekt., 22, 745-754 (1899)

124. YAMAZAKI, J. & L.H. PIETTE
Biochim. Biophys. Acta, 77, 47-64 (1963)
125. YANG, S.F. & N.E. HOFFMANN
Ethylen biosynthesis and its regulation in higher plants.
Ann. Rev. Plant Physiol., 35, 155-189 (1984)
126. YOSHII, H. & H. IMASEKI
Biosynthesis of Auxin-Induced Ethylene. Effects of Indole-3-acetic acid, Benzyladenine and Abscissic acid on endogenous levels of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ACC-Synthese.
Plant & Cell Physiol., 22 (3), 369-379 (1981)
127. YOUNGMAN, R.J. & E.F. ELSTNER
Pflanzentoxikologie
Hrg.: B. Hock und E.F. Elstner, Bibliographisches Institut Mannheim, S. 132 (1984)
128. YOUNGMAN, R.J., P. SCHIEBERLE, H. SCHNABL, W. GROSCH & E.F. ELSTNER
The photodynamic generation of singlet molecular oxygen by the fungal phytotoxin cercosporin.
Phytochemistry and Photobiophysics, 6, 109-119 (1983)
-

Bereits erschienene Arbeiten:

OSSWALD, W.F., W. SCHÜTZ & E.F. ELSTNER

Indol-3-acetic Acid Oxidation and Crocin Bleaching by
Horseradish Peroxidase
Plant Physiol., accepted May 1988

OSSWALD, W.F., S. ZIEBOLL, W. SCHÜTZ & E.F. ELSTNER

p-Hydroxyacetophenon a Fungitoxic Compound in Spruce Needles
Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz,
94 (6), 572-577 (1987)

ELSTNER, E.F., W. SCHÜTZ & G. VOGL

Enhancement of Enzyme-Catalyzed Production of Reactive Oxygen
Species by Suspensions of "Crocidolite" Asbestos fibres
Free Rad. Res. Comms., 1 (6), 355-359 (1986)

ELSTNER, E.F., W. SCHÜTZ & G. VOGL

Modellreaktionen zur Asbesttoxikologie
Elstner, E.F., W. Bors & W. Wilmanns (Hrsg.) in:
Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin
Springer Verlag (1986)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Prof. Dr. A. SCHMIDT, Botanisches Institut der Universität München, und Prof. Dr. E.F. ELSTNER, Botanisches Institut der Technischen Universität München (Biochemisches Labor), in der Zeit von 1985 - 1988.

Herrn Prof. Dr. A. Schmidt danke ich für die Themenstellung und die anregenden Diskussionen.

Herr Prof. Dr. E.F. Elstner stellte mir den Arbeitsplatz und das Rüstzeug für die biochemische Sauerstoffaktivierung zur Verfügung; seine ständige Anteilnahme am Fortgang der Arbeit war ein deutlicher Stimulus.

Herrn Prof. Dr. J. Firl danke ich für seine Unterstützung bei der NMR- und IR-Spektroskopie.

Die zahlreichen Ratschläge von Dr. Wolfgang Oßwald waren mir große Hilfe.

Herrn Dr. Georg Vogl danke ich für die Begleitung während der Laborzeit - er teilte sogar seinen Mantel mit mir.

Die finanzielle Unterstützung erfolgte durch die Shell Int.Petroleum, Den Haag, Niederlande.

Die Firma Waters stellte mir den Photodiodenarray-Detektor zur Verfügung.

Mit Zuspruch und Aufmunterung stand mir stets Sonja C. Riedel zur Seite - Ein herzliches Dankeschön!

L E B E N S L A U F

1955	Geboren am 17. Mai in Immenstadt
1961 - 1965	Volkschule in Immenstadt
1965 - 1968	Gymnasium "Maria Stern" in Immenstadt
1968 - 1974	Allgäu Gymnasium in Kempten
Mai 1974	Abitur
1974 - 1975	Wehrdienst in Neuburg, Mittenwald, Füssen
1975 - 1981	Studium für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Chemie und Biologie an der Technischen Universität München
	Zulassungsarbeit bei Prof. Dr. J. Firl: "Synthese und ^{13}C -NMR-Spektroskopische Untersuchungen an N-Arylketenimininen"
Mai 1981	1. Staatsexamen
1981 - 1983	Pädagogisches Seminar am Josef-Hofmiller- Gymnasium in Freising
Juni 1983	2. Staatsexamen
1983 - 1984	Albertus-Gymnasium in Lauingen
1985 - 1988	Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr.A.Schmidt und Prof.Dr.E.F.Elstner

